Galbonolid A und B
Neue antifungische Makrolid-Antibiotika

Fermentation, Produktionsoptimierung und Untersuchung der Wirkungsweise

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

URSULA FAUTH

aus Stuttgart

1987

Galbonolid A und B
Neue antifungische Makrolid-Antibiotika

Fermentation, Produktionsoptimierung und Untersuchung der Wirkungsweise

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

URSULA FAUTH

aus Stuttgart

1987

Tag der mündlichen Prüfung:	16. Dezember 1987
Dekan:	Prof. Dr. D. Varjú
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Wolf

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, das Interesse und die vielen Anregungen danke ich Prof. Dr. H. Zähner herzlich.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Wolf möchte ich mich für die anregenden Diskussionen bedanken.

Frau Dr. I. Frosch danke ich für die gute Zusammenarbeit und die wissenschaftliche Beratung.

Für seine zuverlässige und hilfsbereite Unterstützung bei der Fermentation bedanke ich mich bei Herrn Chem.-Ing. G. Grewe.

Bei Herrn Dr. A. Mühlenfeld, Institut für Pharmazie und Lebensmitteltechnologie, Universität Erlangen, möchte ich mich für die Isolierung der Reinsubstanzen, die Überlassung der chemischen Daten und insbesondere für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0080

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. MATERIAL UND METHODEN 5

1. Chemikalien.....5

2. Nährmedien und Puffer.....6
2.1. Nährmedien für den Produzentenstamm.....6
2.2. Nährmedien für Teststämme und Puffer.....7

3. Mikroorganismen.....10
3.1. Produzentenstamm.....10
3.2. Testorganismen.....10

4. Kulturbedingungen.....12
4.1. Stammhaltung und Stammaufbewahrung.....12
4.2. Herstellung einer Sporensuspension.....13
4.3. Klonierung.....13
4.4. Schüttelkulturen.....13
4.5. "Resting cell"-Kulturen.....14
4.6. Temperaturgradient.....14

5. Fermentation.....14
5.1. Impfgutvermehrung.....15
5.2. Meß- und Regelvorgänge am Fermenter.....15
5.2.1. pO_2-Messung.....15
5.2.2. pH-Messung und -Regelung.....15
5.3. Fermentationsanalysen.....15
5.3.1. Myceltrockengewicht.....15

Seite

5.3.2. Galbonolid-Bestimmung.....16
5.3.3. Glucose-Bestimmung.....16
5.3.4. Phosphat-Bestimmung.....16
5.3.5. Ammonium-Bestimmung.....16

6. Aufarbeitung und Isolierung.....17
6.1. Extraktion.....17
6.2. Isolierung.....17
6.3. Nachweis der Galbonolide.....17
6.3.1. Dünnschichtchromatographie.....17
6.3.2. Biologische Nachweismethoden.....18
6.3.2.1. Plattendiffusionstest.....18
6.3.2.2. Bioautographie.....18

7. Mutagenese.....18

8. Methoden zur Untersuchung der Wirkungsweise.....19
8.1. Wirkungsspektrum.....19
8.2. Protozoen-Test.....19
8.3. Nematoden-Test.....20
8.4. Wirkung auf den Produzenten.....20
8.5. Bestimmung der fungistatischen/fungiziden Konzentration.....20
8.6. Abhängigkeit der Wirkung von der Wachstumsphase.....21
8.7. Einbau von markierten Vorstufen.....21
8.8. Hämolyse-Test.....22
8.9. Chitin-Synthase.....23
8.10. Liposomentest.....23
8.11. Streifengradienten-Test.....23
8.12. Test an der Na^+K^+-abhängigen ATPase aus Hundeniere.....24
8.13. Differenztest mit Pichia farinosa.....24
8.14. Messung des intracellulären ATP-Gehalts..25
8.15. Mitose bei Bohnenkeimlingen.....25

8.16. Auskeimung von Kressesamen.....26
8.17. Tests auf Antagonisierung.....26
8.17.1. Pyridin-Derivate.....26
8.17.2. Steroide und weitere lipophile Substanzen.....26

III. ERGEBNISSE 28

1. Herstellung von Galbonolid A und B.....28

1.1. Nachweismethoden.....28
1.1.1. Chemischer Nachweis.....28
1.1.2. Biologischer Nachweis.....29
1.2. Fermentation.....30
1.3. Aufarbeitung und Reinigung.....31
1.4. Chemisch-physikalische Charakterisierung.33

2. Produktionsoptimierung.....35

2.1. Verbesserung des Stammes.....35
2.1.1. Klonierung.....35
2.1.2. Mutagenese.....36

2.2. Variation chemischer und physikalischer Parameter.....37
2.2.1. Optimierung des Nährmediums.....37
2.2.2. Optimierung von Nährlösung 1.....39
2.2.3. Kulturführung mit konstanten pH-Werten...40
2.2.4. Einfluß der Inkubationstemperatur.....41

2.3. Verfütterungsversuche.....41
2.3.1. Einfluß von Aminosäuren.....42
2.3.2. Einfluß von Carbonsäuren und Alkoholen...44
2.3.3. Einfluß von Glycerinphosphatiden und Vitamin B_{12}.....44
2.3.4. Kombination von Supplementen.....48

Seite

2.4. Fermentation....48
2.4.1. Einfluß der Belüftung....48
2.4.2. pH-statische Fermentation....51
2.4.3. Feeding-Fermentation....52
2.4.4. Temperatur-Shift....54

3. Untersuchungen zur Wirkungsweise....56

3.1. Wirkungsspektrum....56
3.1.1. Mikroorganismen....56
3.1.2. Protozoen....59
3.1.3. Nematoden....59
3.1.4. Einfluß auf TÜ 2253....60

3.2. Wirkungsart....60
3.2.1. Reihenverdünnungstest....60
3.2.2. Abhängigkeit von der Wachstumsphase....60

3.3. Makromolekülsynthesen....61
3.3.1. Nukleinsäure-Synthese....61
3.3.2. Protein-Biosynthese....61
3.3.3. Fettsäure-Biosynthese....63

3.4. Zellwand....63
3.4.1. Einbauversuche....63
3.4.2. Chitin-Synthase....65

3.5. Zellmembran....66
3.5.1. Liposomentest....66
3.5.2. Streifengradienten-Test....66
3.5.3. Hämolyse-Test....67
3.5.4. Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere....67

3.6. Untersuchung der Wirkung auf die Atmungskette....69

Seite

3.7. Energiestoffwechsel.....69

3.8. Mitose.....70

3.9. Samenauskeimung.....71

3.10. Untersuchungen zur Antagonisierung.....71
3.10.1. Pyridin-Derivate.....71
3.10.2. Steroide, abgeleitete Verbindungen und weitere lipophile Substanzen.....72

IV. DISKUSSION 74

V. ZUSAMMENFASSUNG 87

VI. LITERATUR 89

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
BES	NN-Bis(2-hydroxyethyl)2-amino-ethansulfonsäure
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
cpm	counts per minute
deion.	deionisiert
DSM	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen, Göttingen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	infrarot
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
RT	Raumtemperatur
TCA	Trichloressigsäure
TES	N-Tris(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure
TRICIN	N-Tris(Hydroxymethyl)methylglycin
TÜ	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I, Universität Tübingen
ug	Mikrogramm
ul	Mikroliter
uM	Mikromol
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
vvm	Volumen Luft/Volumen Nährlösung/Minute
Ø	Durchmesser

I. EINLEITUNG

Sekundärmetabolite mikrobieller Herkunft, wie Antibiotika, Enzyminhibitoren, Toxine und Pflanzenwuchsstoffe, gewinnen zunehmend wirtschaftliche Bedeutung (DEMAIN, 1973). Der Erfolg bei der Suche nach neuen biologisch aktiven Substanzen wird jedoch in immer stärkerem Maße von effektiven Screening-Systemen abhängig, da trotz einer Vielzahl von untersuchten Stämmen häufig dieselben Substanzen oder Substanzgruppen wiedergefunden werden. Dennoch steigt die Zahl der neu beschriebenen Antibiotika ständig. Dies ist einerseits auf neue Screening-Methoden, wie beispielsweise das "chemische Screening", zurückzuführen, bei dem im Vergleich der Reaktion von chemischen Sprühreagenzien mit bestimmten chemischen Gruppen die Erkennung neuer Substanzen ermöglicht wird. Ebenso haben zellfreie Systeme, supersensitive Stämme oder Screening-Methoden, bei denen Einflüsse auf Differenzierung und Morphologie untersucht werden (GUNJI et al., 1983) - um nur einige Möglichkeiten zu nennen - zu interessanten Verbindungen geführt (ZÄHNER, 1977). Andererseits haben auch die Entwicklung neuer Technologien zur Detektion, wie HPLC und HPTLC, Verfahren zur raschen Identifizierung durch NMR-Spektroskopie sowie genetische Manipulation von Mikroorganismen durch Mutagenese oder Transformation, die Voraussetzung geschaffen, um zu einem breiten Spektrum neuer Verbindungen mit vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten zu gelangen (OMURA, 1986).

Ein weiterer entscheidender Aspekt für die wirtschaftliche Bedeutung von Sekundärmetaboliten ist die Effektivität der Produktion dieser Stoffwechselprodukte. Wachsende Zellen synthetisieren aus hochmolekularen Kohlenstoff- und Energiequellen durch deren Abbau zu Aminosäuren, Fettsäuren

und Kohlehydraten schließlich Proteine, Enzyme und Coenzyme, Nucleinsäuren, Lipide und Polysaccharide. Ein korrekter Ablauf dieser lebensnotwendigen Prozesse in der Zelle bedingt eine Vielzahl von Enzymen in spezifischer Menge zum richtigen Zeitpunkt mit koordinierter Wirkung. Damit wird die Notwendigkeit einer regulatorischen Kontrolle des Primärstoffwechsels offensichtlich, denn in idealen Zellen werden keine Stoffwechselprodukte in größerem Umfang als notwendig produziert - und dies unabhängig davon, wie die Umweltbedingungen beschaffen sind (DEMAIN, 1973; DREW & DEMAIN, 1977).

Warum produzieren dann Mikroorganismen Sekundärmetabolite wie Antibiotika, die offensichtlich keine Funktion im Hinblick auf Wachstum und Vermehrung der Produzenten besitzen (BU'LOCK, 1965; ZÄHNER, 1978)? Da Antibiotika nur von einer begrenzten taxonomischen Gruppe der Mikroorganismen gebildet werden und auch häufig eine Konvergenz in der Synthese von chemisch verwandten Substanzen zu beobachten ist, kann die Antibiotika-Produktion kein rein zufälliges Phänomen sein, sondern erfolgt in logischer Konsequenz aufgrund der Expression von genetischer Information, die in der DNA des Produktionsstammes codiert ist (MARTIN, 1978). Dies wirft aber wiederum die Frage auf, warum solche Gene überhaupt existieren. Die genetische Information für die Antibiotika-Synthese muß demnach irgendeinen positiven Effekt für den Produzenten beinhalten, andernfalls wären diese Gene im Verlauf der selektiven Evolution verlorengegangen (MARTIN, 1978). Die Annahme einer universellen Funktion von Antibiotika ist sicherlich nicht sinnvoll, da diese Sekundärmetaboliten in ihrer Struktur wie auch hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität so große Unterschiede aufweisen, daß eine Funktion nur individuell diskutiert werden kann (DEMAIN & PIRET, 1981). Beispiele für Sekundärstoffwechselprodukte mit einer möglichen Funktion für den Produzenten wären Ferrioxamin B als Eisen-Transportsystem (BICKEL et al., 1960; ZÄHNER et al., 1960) oder ein Sekundärmetabolit aus Streptomyces viridochromo-

genes, der die Sporenauskeimung des Produzenten hemmt, - vielleicht als Stategie für die Erhaltung der Species unter ungünstigen Bedingungen (ENSIGN, 1976). ZÄHNER (1977) deutet an, daß die antibiotische Wirkung von Sekundärmetaboliten dabei eher eine Zufallserscheinung ist. Sekundärmetabolite können in dem Spielraum, den Primärstoffwechsel, Stoffwechselregulation, Stofftransport, Differenzierung und Morphogenese bieten, ohne negative Beeinflussung dieser 5 Ebenen in beliebiger Variation gebildet werden und möglicherweise dann auch einen Vorteil für die Entwicklung des Produzenten darstellen.

Angesichts der Tatsache, daß Antibiotika in Wildstämmen nur in sehr geringen Mengen synthetisiert werden - da es in der Natur unökonomisch wäre, mehr Energie und Vorstufen für nicht essentielle Substanzen bereitzustellen - spielt die Kenntnis der Antibiotika-Biosynthese und deren Regulation eine immer größere Rolle bei dem Bestreben die Produktion dieser Sekundärmetabolite zu steigern. Möglichkeiten zur Produktionssteigerung können durch genetische Methoden eröffnet werden, beispielsweise durch die Erhöhung der Kopienzahl der Gene, die von Interesse sind, aber auch mittels biochemischer Manipulationen durch Veränderung der Mechanismen, die die Expression der genetischen Information in der Zelle kontrollieren (MARTIN, 1978). Denn die Antibiotika-Produktion unterliegt einer koordinierten Regulation und den gleichen Regulationsmechanismen, die auch den Primärstoffwechsel steuern (Enzyminduktion, feed back-Regulation und Katabolit-Regulation) (DEMAIN, 1973). Es lassen sich hierbei 3 Ebenen unterscheiden (GRÄFE, 1981): Erstens die Regulation durch das Medium, das durch Faktoren wie Phosphat- und Stickstoffgehalt, Glucose-Konzentration, Sauerstoffpartialdruck, pH-Wert und Temperatur die Synthese von Antibiotika beeinflußt; zweitens die Kontrolle durch den Intermediärstoffwechsel, dessen Zwischenprodukte Vorstufen für die Antibiotika-Produktion darstellen oder auch als Induktoren fungieren können. Desweiteren wurde diskutiert, daß der intracelluläre ATP-Gehalt oder

der energetische Zustand der Zellen negativ mit der Biosynthese von Antibiotika korreliert (MARTIN et al., 1978). Die 3. Ebene schließlich umfaßt die Kontrolle im Biosyntheseweg des Antibiotikums, in dem Permeation und Transport, konkurrierende Nebenproduktsynthesen und alternative Stoffwechselwege von Bedeutung sind.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Produktionssteigerung stellt die genetische Manipulation der Produzentenstämme dar. Die Anwendung von mutagenen Agenzien ist nach DEMAIN (1973) eine geeignete Methode, um Überproduzenten zu erhalten, obgleich der Arbeitsaufwand sehr groß ist. Erfolge bei der Suche nach besser produzierenden Mutanten können auch mit Hilfe der Technik der Protoplastenregeneration erzielt werden (IKEDA et al., 1983). So sind die in der Industrie benötigten Hochleistungsstämme hauptsächlich auf Selektion von besser produzierenden Mutanten zurückzuführen (DEMAIN, 1973).

Der Produzent der Galbonolide, Streptomyces galbus ssp. eurythermus, wurde im Rahmen eines antimikrobiellen Screenings gefunden, wobei eine relativ gute antifungische Aktivität verbunden mit morphologischen Veränderungen bei Pilzen beobachtet wurde.
Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in der Produktionsoptimierung der Galbonolide, um größere Mengen für die Strukturanalyse und fungizide Prüfungen bereitzustellen. Weiterhin sollten Untersuchungen Aufschlüsse über die Wirkungsweise geben.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden analysenreine Substanzen der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

Aldrich Chemie, Steinheim	Cholesterin,Ergosterin, Vitamin D_2 u. D_3
Amersham Buchler, Braunschweig	alle Radiochemikalien
Bender & Hobein, Frankfurt/Main	Glasfaserfilter
Boehringer, Mannheim	UV-Test Glucose
Brenntag, Mühlheim/Ruhr	Niax Polyol LTH 67
Difco Laboratories, Detroit/USA	Bacto-Agar, Nutrient Broth, Casein-Pepton,Corn-Meal-Agar, Casamino Acids
Fluka, Buchs/Schweiz	Isocitronensäure
Hellmuth Carroux, Hamburg	Agar für Komplexmedien
Maizena Diät, Heilbronn	D-Glucose
Nattermann, Köln	Phosphatidylcholin Nat 6052, Sojalecithin Nat 6051
Oxoid Deutschland, Wesel	Fleischextrakt,Hefeextrakt, Malzextrakt
Riedel-De-Häen, Seelze-Hannover	Magnesiumhydrogenphosphat-3-hydrat
Roth, Karlsruhe	Glycerin 98 %
Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd	Hyphlo Supercel (Celit)
Schönenberger, Magstadt	Sojamehl
Rohm & Haas Deutschland, Frankfurt/Main	Amberlite XAD-2 Amberlite XAD-16

Serva Feinbiochemica, Heidelberg	L-Isoleucin, BES, HEPES, MES, MOPS, TES, TRICIN
Sigma Chemie, München	Ouabain, Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere, Nicotinsäure
Zinsser, Frankfurt/Main	Toluolszintillator(Quickszin

2. Nährmedien und Puffer

Nach Einstellung des pH-Wertes mit NaOH bzw. HCl wurden alle Nährmedien jeweils 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Für die Herstellung von Testplatten wurden 18 g/l Agar zur Verfestigung zugegeben.

2.1 Nährlösungen für den Produzentenstamm

Medium 1:

Malzextrakt	10 g
Hefeeextrakt	4 g
Glucose	8 g
Leitungswasser	1 l
pH-Wert 7.3	

Medium 2:

Malzextrakt	10 g
Hefeextrakt	4 g
Glucose	4 g
Leitungswasser	1 l
pH-Wert 7.3	

Medium 3:

Glucose	20 g
Asparagin	1.6 g
MES	9.76 g
$CuSO_4*5H_2O$	0.01 g
$MgSO_4*7H_2O$	0.1 g
$ZnSO_4*7H_2O$	0.01 g
KCl	0.1 g
$CaCl_2$	0.1 g
Isoleucin	1.3 g
aq.deion.	1 l
pH-Wert 6.0	

Medium 4:

Glucose	10 g
L-Asparagin	0.5 g
K_2HPO_4	0.3 g
$MgSO_4*7H_2O$	0.2 g
$FeSO_4*7H_2O$	10 g
KOH	0.3 g
aq.deion.	1 l
pH-Wert 7.2	

Medium 5:

Glucose	20 g
Asparagin	2.0 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4*7H_2O$	0.5 g
$CaCl_2$	0.2 g
Spurenelementelsg.	2 ml
aq.deion.	1 l
pH-Wert 7.5	

Spurenelementelösung:

$FeCl_3*6H_2O$	200 mg
$ZnCl_2$	40 mg
$CuCl_2*2H_2O$	10 mg
$MnCl_2*4H_2O$	10 mg
$Na_2B_4O_7*10H_2O$	10 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}*4H_2O$	10 mg
aq.deion.	1 l

Medium 6:

Glucose	8 g
Asparagin	0.5 g
$MgSO_4*7H_2O$	0.5 g
NaCl	0.5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$CaCO_3$	0.2 g
aq.deion.	1 l

Medium 7:

Glucose	8 g
Di-Ammoniumtartrat	4 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	2 g
$MgSO_4*7H_2O$	1 g
$CaCl_2$	0.2 g
$MnSO_4*7H_2O$	0.01 g
Ferrioxamin B	0.02 g
aq.deion.	1 l

2.2 Nährmedien für Testorganismen und Puffer

Medium 8:

Malzextrakt	20 g
Leitungswasser	1 l
pH-Wert 7.0	

Medium 9:

Fleischextrakt	3 g
Casein-Pepton	5 g
NaCl	2.5 g
Leitungswasser	1 l
pH-Wert 7.2	

Medium 10:

Nutrient Broth	8 g
NaCl	5 g
Leitungswasser	1 l
pH-Wert 7.2	

Medium 11:

Fleischextrakt	3 g
Malzextrakt	3 g
Hefeextrakt	3 g
Casein-Pepton	20 g
Glucose	5 g
Leitungswasser	1 l
pH-Wert 7.0	

Medium 12:

a) Casamino acids	7.5 g
Hefeextrakt	10 g
b) KCl	2.0 g
Tri-Na-citrat*$2H_2O$	3.0 g
$MgSO_4*7H_2O$	20.0 g
$FeSO_4*7H_2O$	50 mg
$MnSO_4*H_2O$	200 mg
Agar	15 g
NaCl	200 g

Die Komponenten von a) und b) werden getrennt im Verhältnis 1:9 in Wasser gelöst, erhitzt, gemischt u. zuletzt wird NaCl zugegeben. Das Medium wird nicht sterilisiert.

Medium 13:

Corn-Meal-Agar	17 g
aq.deion.	1 l

Medium 14:

Glucose	4 g
K_2HPO_4	3 g
$(NH_4)_2SO_4$	1 g
$MgSO_4*7H_2O$	0.1 g
NaCl	0.1 g
aq.deion.	1 l

Medium 15:

NH_4Cl	5 g
Natriumacetat	1 g
KCl	1 g
NaH_2PO_4	0.3 g
Leitungswasser	980 ml
pH-Wert 7.0	
nach Sterilisation zugegeben:	
20 ml Glucoselösung	50%
1 ml $CaCl_2$-Lösung	1%
1 ml Vitaminlösung	

Vitaminlösung:

Thiamin-HCl	0.2 g
Myo-Inosit	1.0 g
Nicotinsäure	1.0 g
Ca-Pantothenat	0.1 g
Biotin	1 mg
aq.deion.	100 ml

Medium 16:

K_2HPO_4	13.6 g
$(NH_4)_2SO_4$	2.0 g
$CaCl_2$	0.01 g
$MgSO_4*7H_2O$	0.2 g
$FeSO_4*7H_2O$	0.5 g
Natriumglutamat	5.0 g
Thiamindichlorid	0.34 g
Riboflavin	0.038 g
Ca-Pantothenat	0.4 g
Pyridoxalphosphat	0.19 g
Nicotinsäureamid	0.24 g
Folsäure	0.44 g

Natriumcitrat-Puffer:

Citronensäuremonohydrat	7.98 g
Natriumcitrat *7 H_2O	22 g
Glucosemonohydrat	24.6 g
Adeninin	0.525g
aq.deion.	1 l

alles getrennt sterilisieren

3. Mikroorganismen

3.1. Produzentenstamm

Der Produzent der Galbonolide ist Streptomyces galbus ssp. eurythermus TÜ 2253. Der Stamm wurde 1980 aus einer Bodenprobe isoliert, die in Tunesien gesammelt wurde. Im folgenden wird der Stamm kurz als TÜ 2253 bezeichnet.

3.2. Testorganismen

Bakterien	Kulturbedingungen	
	Temp. °C	Medium
Aerobacter aerogenes TÜ 212	37	10
Agrobacterium tumefaciens ATCC 15955	27	2
Bacillus brevis MIGULA ATCC 9999	37	16
Bacillus cereus SMITH ATCC 6464	37	16
Bacillus subtilis COHN ATCC 6051	37	16
Clostridium pasteurianum WINOGRADSKY ATCC 6013	30	11
Corynebacterium rathayi DOWSEN ATCC 13659	37	16
Corynebacterium spec. WITTLER ATCC 23830	27	16
Escherichia coli K12 W/485 ATCC 23830	37	10
Erwinia carotovora Prof.E.M.Sander Tübingen	27	14
Halobacterium cutirubrum DSM 669	37	12
Klebsiella aerogenes TAYLOR ATCC 13882	37	14
Micrococcus luteus (SCHRÖTER) COHN ATCC 398	27	16
Micrococcus roseus FLÜGGE ATCC 186	27	16
Proteus vulgaris HAUSSER ATCC 13315	37	10

	Kulturbedingungen Temp.°C	Medium
Pseudomonas fluorescens MIGULA ATCC 13525	27	14
Salmonella typhimurium LT2	37	14
Serratia marescens BIZIO BRAYMER ATCC 25419	27	14
Staphylococcus aureus ATCC 11632	37	10
Streptomyces viridochromogenes WAKSMAN & HENRICI TÜ 57	27	16
Pilze		
Alternaria kikuchiana TANAKA TÜ 169	27	9
Arthrinium phaeosporum TÜ 159	27	2
Aspergillus fumigatus FRESENIUS TÜ 149	37	2
Aspergillus viride-mutans CBS 127.56	37	2
Botrytis cinerea PERSOON & Fries TÜ 157	24	8
Byssoclamis nivea TÜ 271	27	2
Candida albicans TÜ 164	27	2
Candida guilliermondii LANG TÜ 8053	27	2
Candida vulgaris TÜ 153	27	2
Cladosporium herbarum TÜ 8041	27	2
Claviceps viridis TÜ 153	27	2
Colletotrichum acutaxum TÜ 8064	27	2
Coprinus cinereus GRAY TÜ 637	37	2
Dipodascus magnuseii TÜ 167	27	2
Endomyces magnuseii LUDWIG TÜ 167	27	2
Fusarium solani TÜ 8014	27	2
Hansenula anomala (HANSEN) SYDOW TÜ 279	27	2
Microsporum canis (BODIN) TÜ 132	27	2
Mucor hiemalis +/- WEHMER TÜ 179/180	27	2
Mucor miehei COONEY & EMERSON TÜ 284	37	2

	Kulturbedingungen	
	Temp.°C	Medium
Mucor racemosus DSM 62760	27	2
Mycotypha africana TÜ 260	27	2
Neurospora crassa arg⁻	27	2
Paecilomyces variotii BAINIER TÜ 137	27	2
Penicillium notatum TÜ 136	27	2
Penicillium puberulum TÜ 8006	27	2
Phoma spec. TÜ 649	27	2
Phytophthora palmivora TÜ 666	27	2
Pichia farinosa HANSEN TÜ 291	27	2
Pyricularia oryzae TÜ 623	27	8
Pythium debarianum HESSE TÜ 293	27	13
Rhizoctonia solani TÜ 535	27	8
Rhodotorula rubra (DEMME) LODDER TÜ 8093	27	8
Saccharomyces cerevisiae HANSEN TÜ 125	27	2
Saprolegnia asterophora DE BARY		
Sordaria macrospora TÜ 128	27	2
Talaromyces flavus TÜ 288	27	2
Trichophyton mentagrophytes BLANCHARD TÜ 510	27	2
Ustilago maydis (BECKMANN)UNGER TÜ 567	27	2
Wingea robertsii TÜ 8101	27	2
Yarrowia lipolytica ATCC 8662	27	2

4. Kulturbedingungen

4.1. Stammhaltung und Stammaufbewahrung

Schrägagarröhrchen mit Medium 2 wurden mit Flüssigkultur von TÜ 2253 beimpft, 20 Tage bei 27°C bis zur vollständigen Sporulation inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Nach maximal 3 Monaten wurden die Kulturen erneu-

ert. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden Sporen in Magermilchlösung (10 %) lyophilisiert.

4.2. Herstellung einer Sporensuspension

Die Oberfläche eines mit 150 ml Medium 2 gefüllten Schrägagarkolbens (500 ml Erlenmeyerkolben) wurde mit 48 h alter Flüssigkultur beimpft und bis zur Sporulation ca. 20 Tage bei 27°C inkubiert. Die Sporen wurden anschließend mit tweenhaltiger Saline (1 Tropfen/100 ml) abgeschwemmt und in einen am Boden mit Glasperlen (Ø=4mm) gefüllten Kolben überführt. Um die Sporenketten zu zerschlagen wurde der Kolben auf einer rotierenden Schüttelmaschine (Typ RC 106, Infors, Basel, Schweiz) bei 120 Upm ca. 30 min geschüttelt. Die Sporensuspension wurde über Glaswatte filtriert und zweimal mit kalter Saline gewaschen (4000 Upm, 10 min) und zur Aufbewahrung in 30% Glycerin bei -70°C tiefgefroren. Die Titerbestimmung erfolgte nach entsprechender Verdünnung in Saline auf Platten mit Medium 2.

4.3. Klonierung

Mit Einzelkolonien, die aus einer entsprechend verdünnten Sporensuspension stammten, wurden 100 ml Kolben mit Nährlösung 1 beimpft. Die einzelnen Klone wurden auf Produktion getestet und morphologisch charakterisiert. In einem zweiten Klonierungsschritt wurden von den Klonen mit der höchsten Produktion wieder Einzelkolonien durch Vereinzelungsausstrich hergestellt und mit ihnen der Vorgang wiederholt.

4.4. Schüttelkulturen

Alle Schüttelkulturen wurden in Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich auf der rotierenden Schüttelmaschine bei 27°C und 120 Upm inkubiert. 500 ml Kolben enthielten 100 ml, 100 ml Kolben 20 ml Nährlösung und wurden mit sporuliertem Mycel von Schrägagarröhrchen bzw. mit Flüssig-

kultur beimpft. In Nährlösungsversuchen wurden Kolben, die jeweils 100 ml Nährlösung enthielten, mit 5 % einer 48 h alten Vorkultur beimpft, die in Medium 1 gewachsen war.

4.5. "Resting cell"-Kulturen

In Medium 1 angezogene Schüttelkulturen wurden nach 24, 36, 48, 60 bzw. 72 h über Büchnertrichter abfiltriert, mit gleichem Volumen steriler Saline zweimal zentrifugiert (4000 Upm, 10 min) und in steriler Saline mit der Hälfte des ursprünglichen Volumens resuspendiert. Die gewaschene Mycelsuspension wurde dann auf Kolben verteilt, die mit dem gleichen Volumen an doppelt konzentriertem "resting-cell"-Medium (Medium 3) gefüllt waren und wie unter 4.3. beschrieben inkubiert.

4.6. Temperaturgradient

Die optimale Temperatur für die Produktion der Galbonolide wurde im Temperature Gradient Incubator (Modell TN-3, Toya Kagaku Sangyo, Tokyo, Japan) ermittelt. In Intervallen von ca. 0.5 °C wurden 30 Winkelreagenzgläser über einen Temperaturgradienten von 19 - 33.5 °C verteilt. Die Gläser, die mit 9.5 ml Nährlösung 1 gefüllt waren, wurden mit 0.5 ml einer 48 h alten Vorkultur beimpft und unter oszillierendem Schütteln (Stufe 1) inkubiert.

5. Fermentation

Untersuchungen zur Produktionsoptimierung der Galbonolide wurden im 10 l Blattrührfermenter vom Typ Biostat E (Braun, Melsungen) durchgeführt. Fermentationen im 100 l Maßstab (Fermentertyp: F-130 Fermacell, New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA) dienten zur Herstellung größerer Mengen der Antibiotika.

5.1. Impfgutvermehrung

Vorkulturen von TÜ 2253 in Medium 1 für Fermenterkulturen wurden wie unter 4.4. beschrieben für 48 h inkubiert, vereinigt und in den Reaktor überführt. Das Impfvolumen betrug 10 %. Für 100 l Fermentationen wurde die gesamte Kultur eines 10 l Vorfermenters nach 24 h in den Produktionsfermenter überführt.

5.2. Meß- und Regelvorgänge am Fermenter

5.2.1. pO_2-Messung

Während der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck in der Kultur kontinuierlich mit einer in situ sterilisierbaren Sauerstoffelektrode (Modell IL 531) der Firma Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz, gemessen.

5.2.2. pH-Messung und -Regelung

Die kontinuierliche pH-Messung sowie die pH-Regelung erfolgte mit einer in situ sterilisierbaren pH-Elektrode vom Typ 465-VT der Firma Ingold.

5.3. Fermentationsanalysen

5.3.1. Myceltrockengewicht

Zur Bestimmung des Myceltrockengewichts wurden 5 ml Kultur über Filter (MN 615, Ø=4.5 cm, Fa. Machery & Nagel, Düren) abgesaugt. Die Filter wurden zuvor bei 100 °C getrocknet und nach 1 h Temperaturausgleich bei RT gewogen. Die Filter mit Mycel wurden ebenso behandelt. Aus der Differenz beider Messungen wurde das Myceltrockengewicht berechnet.

5.3.2. Galbonolidbestimmung

Die quantitative Bestimmung von Galbonolid A erfolgte mit dem Plattendiffusionstest wie bei ZÄHNER & MAAS (1972) beschrieben. Hierzu wurden Proben der Kultur abzentrifugiert. Filterrondellen von 6 mm Ø (Machery & Nagel, Düren) wurden in das Kulturfiltrat getaucht, auf einer Glasplatte getrocknet und auf Testplatten gelegt. Der Test wurde an der Riesenkolonie von Botrytis cinerea durchgeführt. Anhand einer Eichkurve mit Reinsubstanz von Galbonolid A, die in gleicher Weise mit dem Plattendiffusionstest erstellt worden war, wurde die Konzentration des Antibiotikums im Kulturfiltrat bestimmt.

5.3.3. Glucose-Bestimmung

Die momentane Glucose-Konzentration im Kulturfiltrat wurde mit einem Reagenziensatz der Fa. Boehringer, Mannheim, enzymatisch bestimmt.

5.3.4. Phosphat-Bestimmung

Die Bestimmung erfolgte analog dem Phosphattest der Firma Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen. Die Reagenzien sowie die Durchführung sind bei REUSCHENBACH (1986) beschrieben.

5.3.5. Ammonium-Bestimmung

Die Bestimmung der Ammonium-Konzentration wurde nach der Methode von FAWCETT & SCOTT (1960) durchgeführt. Der Test beruht auf der Entstehung eines blauen Indophenolfarbstoffes, der durch Ammonium-Ionen in Gegenwart von Phenol-Nitroprussid und alkalischer Hyperchlorid-Lösung gebildet wird. Der Farbstoff kann anschließend photometrisch bei 546 nm gemessen werden.

6. Aufarbeitung und Isolierung

6.1. Extraktion

Die Kultur wurde nach Zugabe von 2% Celit mit einer Mehrschichtenfilterpresse (Schenk Filterbau, Schwäbisch Gmünd) unter Verwendung von Filterschichten (Filterschicht C 150) zweimal geklärt. Kulturfiltrat und Mycel wurden getrennt aufgearbeitet.

Das Kulturfiltrat wurde mit insgesamt der Hälfte des Volumens an Ethylacetat dreimal extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden verworfen, die Ethylacetat-Phasen am Rotationsverdampfer bis zum wässrigen Rückstand eingeengt. Das Mycel wurde mit Methanol aufgeschlossen, wobei bei 10 l Fermentern dreimal mit insgesamt 6 l, bei 100 l Fermentern dreimal mit insgesamt 50 l extrahiert wurde. Nach dem Filtrieren wurde der Methanolextrakt am Rotationsverdampfer bis zum wässrigen Rückstand eingeengt. Die wässrigen Rückstände aus Kulturfiltrat- bzw. Mycelextraktion wurden anschließend jeweils dreimal mit der Hälfte des Volumens an Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden bis zu den öligen Rohextrakten eingeengt.

6.2. Isolierung

Die weitere Reinigung der Rohextrakte aus Kulturfiltrat bzw. Mycel, sowie die Isolierung der Reinsubstanzen wurden von A. Mühlenfeld, Universität Erlangen, übernommen.

6.3. Nachweis der Galbonolide

6.3.1. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten 60 F_{254} der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Die Durchführung erfolgte nach STAHL (1967). Die Fließmittelsysteme sowie die Rf-Werte sind im Ergebnisteil (III.1.1.1.) angegeben.

6.3.2. Biologische Nachweismethoden

6.3.2.1. Plattendiffusionstest

Die quantitative Bestimmung der Galbonolide erfolgte im Plattendiffusionstest wie unter 5.3.2. beschrieben. Die Durchführung erfolgte routinemäßig an der Riesenkolonie von Botrytis cinerea, für geringe Antibiotika-Konzentrationen wurden Testplatten mit Rhodotorula rubra verwendet. Die Herstellung der Testplatten ist unter 8.1. beschrieben.

6.3.2.2. Bioautographie

Über ein entwickeltes Dünnschichtchromatogramm (vgl. 6.3.1.) wurde ein Tesafilmstreifen geklebt und in 5 mm lange Abschnitte unterteilt. Die Tesafilmabschnitte wurden danach wieder von der DC-Alufolie abgelöst. Nach Inkubation im Plattendiffusionstest mit Botrytis cinerea konnten die Rf-Werte der biologisch aktiven Substanzen bestimmt und mit den Rf-Werten der durch Sprühreagenzien chemisch nachgewiesenen Substanzen verglichen werden.

7. Mutagenese

Die Mutagenese mit 8-Methoxypsoralen bei gleichzeitiger Bestrahlung mit UV-Licht ist bei TOWNSEND et al. (1971) beschrieben. In einer offenen Glaspetrischale wurden 18 ml Sporensuspension von TÜ 2253 (6.5×10^6 Sporen/ml) mit 2 ml einer äthanolischen 8-Methoxypsoralen-Lösung (1 mg/ml) für 10 min bei RT vorinkubiert. Für 60 min erfolgte aus einer Entfernung von 10 cm eine UV-Bestrahlung (366 nm) der Sporen. Alle 5 min wurde eine Probe entnommen, 2 min abzentrifugiert und einmal mit Saline gewaschen. Nach einer dem Zeitwert entsprechenden Verdünnung wurden 0.1 ml auf Platten mit Medium 2 ausplattiert und für 3 Tage bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde der Titer der überlebenden Sporen bestimmt.

8. Methoden zur Untersuchung der Wirkungsweise

8.1. Wirkungsspektrum

Die Empfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen gegen Galbonolid A und B wurde im Plattendiffusionstest nach ZÄHNER & MAAS (1972) bestimmt. Testplatten mit Bakterien wurden unter Verwendung von jeweils 1 ml über Nacht angezogener Vorkultur auf 200 ml Agar hergestellt. Die antifungische Aktivität der Galbonolide wurde mit drei Methoden (V, S, K) bestimmt:

V: Verwendung einer Vorkultur wie bei Testplatten für Bakterien.
S: Verwendung einer Sporensuspension wie unter 4.2. beschrieben, wobei Sporen eines gut sporulierten Schrägagarröhrchens mit 3 ml tween-haltiger Saline abgeschwemmt wurden. Die Herstellung der Testplatten erfolgte mit 1 ml der gewaschenen und im gleichen Volumen Saline resuspendierten Sporensuspension auf 200 ml Agar.
K: Verwendung von Testplatten mit Riesenkolonien wie unter 5.3.2. beschrieben.

Die Agarplatten waren einheitlich mit 10 ml Agar gefüllt, mit Ausnahme der Platten mit Riesenkolonien, deren Füllvolumen 17.5 ml Agar betrug.

8.2. Protozoen-Test

Der Versuch wurde in Mikrotiterplatten mit einer Kultur von Paramecium caudatum durchgeführt. Jeweils 100 ul Paramecien-Kultur wurden in jedes Loch der Mikrotiterplatte gegeben und 1 ul Wasser, bzw. Lösungsmittel, bzw. Galbonolid A-Lösung zupipettiert. Die Kulturen wurden nach 8, 24 und 48 h auf ihre Vitalität untersucht.

8.3. Nematoden-Test

Der Test wurde mit Caenorhabditis elegans durchgeführt. Die Versuchsanordnung ist bei RABENHORST (1986) beschrieben. Für die Durchführung des Tests danke ich Frau I. Rindfleisch und Frau Dr. I. Frosch.

8.4. Wirkung auf den Produzenten

Von einer Sporensuspension von TÜ 2253 wurden entsprechende Verdünnungen hergestellt und auf Petrischalen mit Medium 2 ohne und mit Galbonolidzusatz (1 ug/ml) ausplattiert. Am 3., 4., 5. und 6. Tag der Inkubation wurden die gewachsenen Einzelkolonien gezählt.

8.5. Bestimmung der fungistatischen/fungiziden Konzentration

In Erweiterung des Reihenverdünnungstests (ZÄHNER & MAAS, 1972) wurde untersucht, ob die Wirkung von Galbonolid A fungistatisch ist, d.h. es bestünde eine reversible Hemmung nach Auswaschen des Antibiotikums, oder ob Galbonolid A fungizid, d.h. abtötend, wirkt. Als Testorganismus wurde Rhodotorula rubra in Medium 15 verwendet. Eine über Nacht angezogene Kultur wurde auf ca. 5×10^5 Zellen/ml verdünnt und zu folgendem Versuchsansatz pipettiert:

Glas:	1	2	3	4	5	6
Medium 15 (ml):	2	2	2	2	2	2
Vorkultur (ml):	20	20	20	20	20	20
Zusatz (10 ul):	a	b	c	d	e	f
Inkubationstemperatur (°C):	27	27	27	27	27	4

Zusätze: a: Galbonolid A 100 ug/ml
b: " 10 ug/ml
c: " 1 ug/ml
d: " 100 ng/ml
e: H_2O
f: H_2O

Nach 24 h Inkubation wurde der Inhalt von Glas 6 und der jenes Glases, in dem kein Wachstum festgestellt werden konnte, abzentrifugiert, einmal mit jeweils 2 ml Saline gewaschen und anschließend wurden die Zellen im gleichen Volumen resuspendiert. Nach Verdünnung um den Faktor 10 bzw. 100 wurden jeweils 0.1 ml jeder Verdünnungsstufe auf Agarplatten mit Medium 15 ausplattiert und 24 h inkubiert.

8.6. Abhängigkeit der Wirkung von der Wachstumsphase

Die Wirkung von Galbonolid A in Abhängigkeit von der Wachstumsphase wurde bei Rhodotorula rubra untersucht. Mit 1.5 % einer über Nacht angezogenen Kultur wurden 100 ml Erlenmeyerkolben, die Medium 15 enthielten, beimpft und bei 27°C auf der rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurde Galbonolid A in der Endkonzentration von 1 ug/ml zu jeweils einer Kultur gegeben. Von allen Kulturen wurden regelmäßig Proben genommen.
Die Messung des Wachstums der Kultur erfogte im Photometer bei 578 nm. Die Bestimmung der Lebendkeimzahl ergab sich aus der Berechnung des Titers der auf Agarplatten mit Medium 15 ausplattierten Proben.

8.7. Einbau von markierten Vorstufen

Den Einfluß von Galbonolid A auf die Makromolekülsynthesen wurde durch Einbau radioaktiv markierter Vorstufen nach der Methode von HAMAMOTO et al. (1985) untersucht. Saccharomyces cerevisiae wurde in Medium 15 bis zu einer optischen Dichte bei 578 nm von 0.8 angezogen. 2 ml der Kultur wurden nach Vorinkubation mit Galbonolid A für 10 min bei

30 °C mit den markierten Vorstufen versetzt. Nach 15, 30 und 60 min wurden jeweils 100 ul Probe zu 100 ul eiskalter TCA (10 %) gegeben, eine Stunde auf Eis stehen gelassen und über Glasfaserfilter (Whatman GF/C, Ø=2.5 cm) abgesaugt. Die Filter wurden dreimal mit jeweils 1 ml eiskaltem Wasser gewaschen, bei 70 °C eine Stunde getrocknet und in 5 ml Toluolszintillator gemessen. Bei Einbauversuchen mit markiertem Acetat bzw. Glucose wurden die Zellen vor der Inkubation gewaschen und in Medium 15 ohne Acetat bzw. Glucose resuspendiert. Bei der Untersuchung der Biosynthesen von DNA und RNA mit Adenin wurden bei jedem Zeitwert zwei Proben genommen. Die erste Probe wurde wie oben beschrieben behandelt, die zweite Probe bei 30 °C mit 100 ul 2 N NaOH für 30 min inkubiert und anschließend zu 200 ul eiskalter TCA (20 %) gegeben. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben beschrieben. Die spezifischen Aktivitäten der markierten Vorstufen sind im Ergebnisteil angegeben.

8.8. Hämolyse-Test

Eine mögliche hämolytische Wirkung von Galbonolid A wurde bei Human-Erythrocyten untersucht. Die Präparation der Erythrocyten-Suspension erfolgte aus einer Blut-Vollkonserve, die mit 10 Vol % Natriumcitratpuffer stabilisiert war. Hiervon wurden 4 ml Blut fünfmal mit Saline gewaschen (10 min, 3000 Upm). 1 ml gewaschene Erythrocyten wurden mit 11.5 ml Saline auf 8 % verdünnt. Diese Erythrocyten-Suspension wurde in Reagenzgläsern in einem Schüttelwasserbad bei 37 °C nach Zugabe folgender Zusätze inkubiert:

Glas 1: 1 ml Erythr.-Susp. + 10 ul Galbonolid A (1 mg/ml)
Glas 2: 1 ml " + 10 ul Galbonolid B (1 mg/ml)
Glas 3: 1 ml " + 10 ul MeOH
Glas 4: 1 ml " + 10 ul Saline

Zum Zeitpunkt 0, sowie nach 30, 60 und 120 min Inkubation wurden jeweils 100 ul Probe zu 900 ul Saline gegeben und bei 5000 Upm 10 min zentrifugiert. Die Absorption im Überstand wurde bei 405 nm im Photometer gemessen. Der Extinktionswert für 100 % Hämolyse ergab sich aus der Messung der Probe zum Zeitpunkt 0, die anstatt von 900 ul Saline mit 100 ul Triton-Saline (1 %) und 800 ul Saline versetzt und nicht zentrifugiert wurde.

8.9. Chitin-Synthase

Die Präparation der Mikrosomen aus Coprinus cinereus erfolgte nach der Methode von GOODAY und ROUSSET-HALL (1975). Die Anzucht erfolgte in Kolben, die mit 150 ml Medium 2-Agar (pH 6.5) gefüllt waren. Im Versuchsansatz mit einem Endvolumen von 25 ul befanden sich 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM Na_2-EDTA und 1.6 mM UDP-N-Acetylglucosamin mit 1.85 kBq ^{14}C-UDP-N-Acetylglucosamin. Der Start der Enyzmreaktion erfolgte durch Zugabe von 10 ul Mikrosomen-Präparation. Nach 10 min Inkubation bei 25 °C wurde die Reaktion durch Erhitzen für 2 min auf 95 °C gestoppt. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte nach GOODAY und ROUSSET-HALL (1975).

8.10. Liposomen-Test

Die Durchlässigkeit der Membran für einwertige Ionen unter dem Einfluß von Galbonolid A wurde durch Messung an Lipidvesikeln untersucht. Die Präparation der Liposomen sowie die Messung mit der pH-Elektrode sind bei BAUMGARTNER (1985) beschrieben. Die Konzentration von Galbonolid A im Versuchsansatz betrug 0.1 und 1.0 ug/ml.

8.11. Streifengradienten-Test

Eine ionophore Wirkung von Galbonolid A für zweiwertige Ionen wurde im Streifengradienten-Test untersucht. Die Testanordnung ist bei DRAUTZ (1975) beschrieben. Als Test-

keim wurde Rhodotorula rubra in Medium 15 verwendet. Die Petrischalen enthielten einen linearen Gradienten von 0 bis zur maximalen Konzentration von

0.64 mM für Ca
0.61 mM für Mg
0.018 mM für Mn
0.018 mM für Fe
0.01 mM für Zn
0.003 mM für Cu

Es wurden für jedes zweiwertige Ion zwei Sorten von Petrischalen hergestellt:

A) Unterschicht: Medium 15
   Oberschicht: Medium 15 + Rhodotorula + Ionen
B) Unterschicht: Medium 15 + Ionen
   Oberschicht: Medium 15 + Rhodotorula

In Richtung der linearen Gradienten wurden Filterpapierstreifen (0.5 x 8 cm) gelegt, auf die zuvor 50 ul Galbonolid A-Lösung (10 ug/ml) aufgetragen worden war. Die Petrischalen wurden bei 27°C 36 h inkubiert.

8.12. Test an der Na^+K^+-abhängigen ATPase aus Hundeniere

Die Reagenzien und die Durchführung sind bei BAUMGARTNER (1985) beschrieben. Der Nachweis für die Enzymaktivität erfolgte über freigesetztes Phosphat, das nach der modifizierten Bestimmungsmethode von CHEN et al. (1956) kolorimetrisch gemessen wurde.

8.13 Differenztest mit Pichia farinosa

Mit dieser Methode sollte gezeigt werden, ob die Galbonolide Hemmstoffe der Atmungskette sind. Als Testkeim diente Pichia farinosa, die Testplatten enthielten Nährmedium 15, wobei als C-Quelle 10 g/l Glucose bzw. 10 g/l Acetat verwendet wurde. Die Versuchsdurchführung ist bei SCHANZ (1978) beschrieben.

8.14. Messung des intracellulären ATP-Gehaltes

Eine ATP-Messung durch Bioluminiszenz wird mit dem Luciferin/ Luciferase-System ermöglicht. Das Enzymsystem katalysiert die Oxydation von Luciferin unter ATP-Spaltung. LUNDIN et. al. (1976) zeigten, daß bei Zugabe des Enzymsystems zu einer Probe die Lichtemission proportional zur ATP-Konzentration in der Probe ist. Der intracelluläre ATP-Gehalt mit dem "Bioluminiscence ATP Monitoring Kit" (LKB-Wallac, Stockholm/Schweden) wurde bei einer logarithmisch wachsenden Zellkultur von Rhodotorula rubra in Medium 15 bestimmt. In bestimmten Zeitabständen wurden 200 ul der Kultur in 10 ml 90°C heißen KOH-Puffer (10 ml Tris, 2 ml EDTA, 10 ml KOH) pipettiert, nach 60 Sekunden gemischt und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 50 ul der abgekühlten Probe in 1 ml ATP-Monitoring Agent gegeben; die Bioluminiszenz wurde sofort im Luminometer (LKB-Wallac Luminometer 1250-001, LKB, München) erfaßt und über einen Schreiber mit Verstärker (Potentiometric recorder 2210-032, LKB, München) registriert. Zur Konzentrationsbestimmung diente eine auf die gleiche Weise erstellte Eichkurve mit ATP-Standard (Aktivität des Reagenz: 100 mV-Signal bei 10^{-8} M ATP-Standard).

8.15. Mitose bei Bohnenkeimlingen

Die Wirkung von Galbonolid A auf die Mitose wurde bei Keimlingen der Ackerbohne (Vicia faba) untersucht. Bohnensamen wurden zwischen befeuchteten, ungebleichten Zellstofflagen auf der Siebplatte eines Exsikkators bei RT zum Auskeimen gebracht. Der Exsikkator war bis 2 cm unterhalb der Siebplatte mit Wasser gefüllt, durch Einleitung von Druckluft wurde für genügend Luftfeuchtigkeit und Belüftung gesorgt. Nach 4 Tagen Inkubation wurden die Keimlinge, deren Wurzeln ca. 2 - 5 cm lang waren, auf eine gelochte Aluminium-Folie gesetzt, die über ein Gefäß mit Wasser gespannt war, sodaß sich die Wurzeln der Keimlinge im Wasser befanden. Nach weiteren 3 Tagen Wachstum wurden

die Wurzeln der Keimlinge in Reagenzgläser gesteckt, die die Versuchslösungen enthielten. Nach 24, 48 und 72 h wurden Schnittpräparate der Seitenwurzeln angefertigt und im Mikroskop untersucht.

8.16. Auskeimung von Kressesamen

Der Versuch wurde in Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) durchgeführt. In jedem Loch der Platte befanden sich 50 ul Flüssigkeit und ein Samenkorn. Die Mikrotiterplatten wurden mit Parafilm abgedeckt um das Verdunsten der Flüssigkeit zu verhindern und bei RT inkubiert. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurden die Keimlinge untersucht und die Länge der Wurzeln gemessen.

8.17. Tests auf Antagonisierung

8.17.1. Pyridin-Derivate

In der Versuchsanordnung wurden Agarplatten mit Medium 15 und Rhodotorula rubra als Testkeim verwendet. Ein Teil der Platten enthielt zusätzlich noch Nicotinsäure, NAD bzw. Chinolinsäure in verschiedenen Konzentrationen, die in sterilfiltrierter Lösung dem Agar vor dem Gießen zugegeben wurden. Nach Erstarren des Agars wurden Filterrondellen aufgelegt, die mit verschiedenen Konzentrationen an Galbonolid A bzw. Galbonolid B beschickt worden waren.

8.17.2. Steroide und weitere lipophile Substanzen

Die Versuche der Antagonisierung erfolgten auf Grund der schlechten Löslichkeit der Steroide in wässrigem Medium im Plattendiffusionstest in der Weise, daß Antibiotikum und nach Trocknung die jeweils zu untersuchende Substanz auf dieselbe Filterrondelle pipettiert wurden. Mit den weiteren lipophilen Substanzen wurde in gleicher Weise verfahren. Die getrockneten Filterrondellen wurden auf standardisierten Testplatten (10 ml) mit Medium 15 und Rhodotoru-

la rubra als Testkeim gelegt; nach 24 h Inkubation wurden die Hemmhöfe abgelesen. Die Steroide wurden in einer Lösungsmittelmischung von Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 gelöst, die Verdünnung der Ölsäure erfolgte in gleicher Weise. Sojalecithin und Phosphatidylcholin wurden unverdünnt eingesetzt, Eigelb mit Wasser verdünnt und Vitamin D in Wasser gelöst.

III. ERGEBNISSE

1. Herstellung von Galbonolid A und B

1.1. Nachweismethoden

1.1.1. Chemischer Nachweis

In Proben des Kulturfiltrats bzw. der aufgereinigten Extrakte konnte Galbonolid A und B durch Dünnschichtchromatographie und Sprühreagenzien nicht nachgewiesen werden. Der Grund hierfür war die geringe Konzentration, in der Galbonolid A im Kulturfiltrat vorlag; in Rohextrakten verhinderten lipophile Verunreinigungen den Nachweis der Antibiotika. Eine Detektion in dieser Weise war nur bei den Reinsubstanzen möglich. In Tabelle 1 sind die Fließmittelsysteme und die Rf-Werte angegeben.

Tab. 1: Rf-Werte von Galbonolid A und B in verschiedenen Fließmittelsystemen

Fließmittelsystem	Rf-Werte	
	Galbonolid A	Galbonolid B
Tetrachlorkohlenstoff/Methanol (90/10)	0.33	0.43
Cyclohexan/Ethylacetat (50/50)	0.26	0.40

Nach Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme und Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure zeigte Galbonolid

B eine ebenfalls blaue Färbung, aber nach grau-blau verblassend. Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure ergab für Galbonolid A und B rosa Flecken. Eine sehr schwache UV-Absorption bei 254 nm war bei einer aufgetragenen Menge von mindestens 500 ng erkennbar. Wie aus dem UV-Spektrum (Abb. 5) hervorgeht, zeigt Galbonolid A Endabsorption und nur schwache Absorption bei 230 nm. Aufgrund dieser Tatsache und der oben erwähnten Ursachen war auch eine Detektion durch HPLC mit Proben des Kulturfiltrats und der aufgereinigten Extrakte nicht möglich.

1.1.2. Biologischer Nachweis

Der biologische Nachweis der Galbonolide bei Nährlösungsversuchen und Fermentationen erfolgte im Plattendiffusionstest an der Riesenkolonie von Botrytis cinerea. Eine quantitative Aussage über die Galbonolid A-Konzentration war über eine Eichkurve mit Reinsubstanz (Abb. 1) mög-

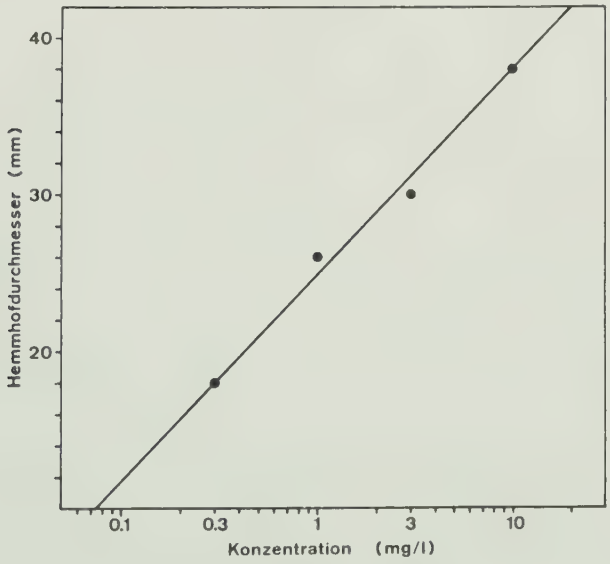


Abb. 1: Größe des Hemmhofdurchmessers in Abhängigkeit von der Konzentration von Galbonolid A im Plattendiffusionstest mit Botrytis cinerea.

lich. Da sich größere Fehlerquellen ergaben, die einerseits durch das Ablesen der Hemmhöfe und andererseits durch die Tatsache begründet waren, daß der Hemmhofdurchmesser proportional dem Logarithmus der Konzentration des Antibiotikums ist, wurde auf eine definierte Angabe der Konzentration in mg/l verzichtet. Alle Konzentrationsangaben sind deshalb bei Abbildungen und Tabellen in mm Hemmhofdurchmesser ausgedrückt.

1.2. Fermentation

In Abb. 2 ist der Verlauf einer 10 l Batchfermentation in Medium 1 dargestellt, die Inkubationstemperatur betrug 27°C, die Luftzufuhr 0.6 vvm und die Geschwindigkeit des Blattrührers 200 Upm. Galbonolid A wurde mit Beginn der Fermentation gebildet und erreichte nach ca. 40 h Inkubation das Maximum, die Konzentration betrug hier 0.75 mg/l. Der pH-Wert fiel von anfangs 6.8 auf 5.5, infolge der Metabolisierung der Glucose, die nach 25 h im Kulturfiltrat nicht mehr nachzuweisen war. Durch weiteren Abbau der aus der Glucose-Verwertung entstandenen Säuren stieg der pH-Wert wieder an. Das Maximum der Produktion lag stets bei einem pH-Wert um 6.5, wurde das Medium alkalischer, so war eine rasche Verringerung der biologischen Aktivität feststellbar. Parallel zur Produktbildung stieg auch das Myceltrockengewicht. Nach Erreichen des Maximums nahm die Viskosität der Kultur deutlich ab, als Folge der beginnenden Lyse der Zellen. Da der Verlauf der Produktbildung mit dem Wachstum von TÜ 2253 sehr eng korrelierte, ist eine deutliche Trennung in Tropho- und Idiophase nicht gegeben. Routinemäßig durchgeführte Ammonium- und Phosphat-Bestimmungen ergaben, daß im Fall von Ammonium-Ionen die Werte während der Fermentation zwischen 0.04 und 0.07 mM schwankten; gegen Ende der Fermentation, zwischen der 60. und 70. Stunde stiegen die Mengen auf 0.4 - 0.6 mM an, zu einem Zeitpunkt, zu dem auch die Lyse der Zellen eingesetzt hatte. Der Nachweis von Phosphat-Ionen war während der gesamten Fermentationszeit nicht möglich, d.h., die

Werte müssen unterhalb der Nachweisgrenze von 0.2 mM Phosphat gelegen haben.

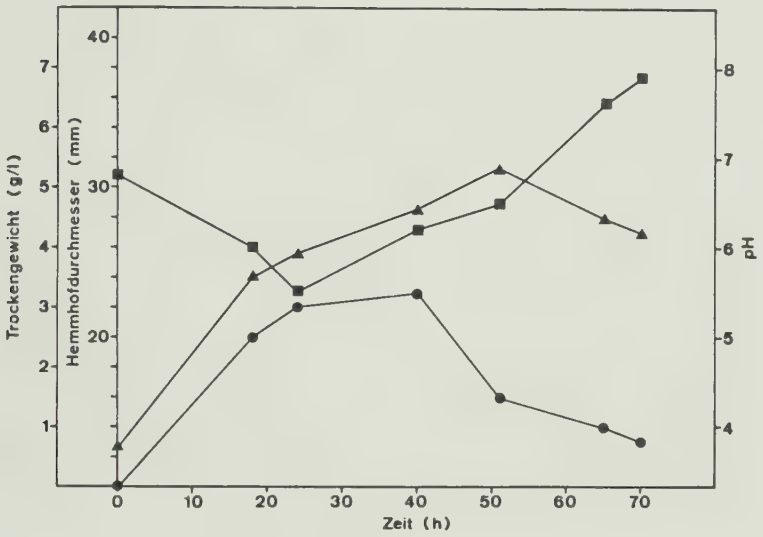


Abb. 2: 10 l Batch-Fermentation mit TÜ 2253 in Medium 1 bei °27 C, 0.6 vvm und 200 Upm:
—●— Aktivität; —▲— Trockengewicht; —■— pH

1.3. Aufarbeitung und Reinigung

In Abbildung 3 ist das Schema für die Aufarbeitung und Reinigung der Galbonolide wiedergegeben. Versuche, die Extraktionen des Kulturfiltrats durch Anreicherung über Adsorberharze zu ersetzen, erwiesen sich nicht als sinnvoll. Bei Verwendung von XAD 2 und Elution mit 100 % Methanol wurden etwa 70 - 80 % der biologischen Aktivität wieder erhalten, bei XAD 16 waren es nur 40 - 50 %.
Da die Galbonolide instabil bei sehr sauren oder alkalischen pH-Werten sind (vgl. 1.4.), wurde versucht die Effektivität der Extraktionen durch Pufferzusatz zu vergrößern. Die Extraktionsmittel Ethylacetat und Dichlor-

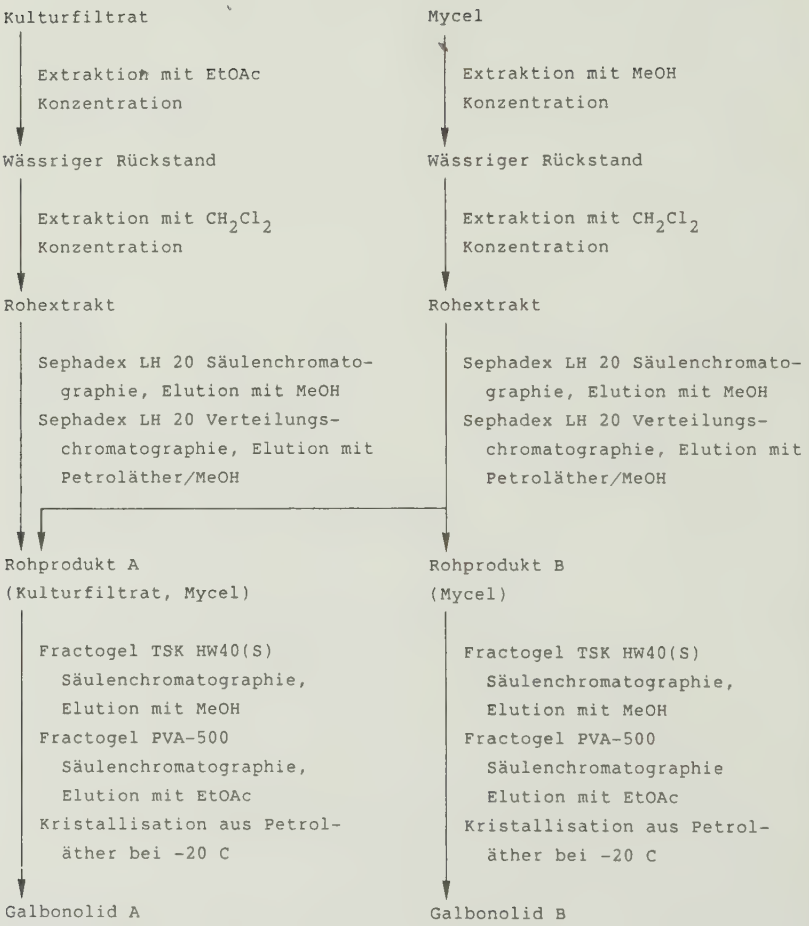


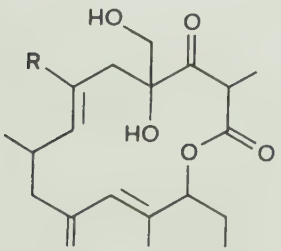
Abb. 3: Schematische Darstellung der Aufarbeitung und Isolierung von Galbonolid A und B

methan, die geringe Spuren an Säuren enthalten, wurden mit Phosphatpuffer pH 6.0 (DOCUMENTA GEIGY, 1968) extrahiert und anschließend für die Aufarbeitung verwendet. Bei Extraktionen mit Ethylacetat war keine Verbesserung zu erzielen, im Falle von Dichlormethan konnte die Ausbeute jedoch um ca. 10 % gesteigert werden.

1.4. Chemisch-physikalische Charakterisierung.

Galbonolid A wurde aus dem Kulturfiltrat und aus dem Mycel von TÜ 2253 isoliert, Galbonolid B war nur im Mycel vorhanden. Beide Antibiotika liegen rein als weiße, kristalline Nadeln vor (Schmelzpunkte: 68 °C für Galbonolid A, 109 - 112°C für Galbonolid B) und sind gut in Methanol, Aceton, Dichlormethan, Chloroform und Petroläther löslich, in Wasser jedoch unlöslich (ACHENBACH et al., 1985). Die Galbonolide zeigen bei pH 5.5 und 6.0 die größte Stabilität, bei pH 7.0 nimmt die Stabilität deutlich ab, die Toleranz sauren pH-Werten gegenüber ist nur geringfügig größer (ACHENBACH et al., 1987).

Galbonolid A und B sind Makrolid-Antibiotika und gehören nach der Einteilung von OMURA (1984) zur Gruppe der ungewöhnlichen Makrolide. Sie besitzen einen 14-gliedrigen Lactonring und unterscheiden sich nur am Kohlenstoff-Atom 6, wobei Galbonolid A dort eine O-Methyl-Gruppe, Galbonolid B eine Methyl-Gruppe besitzt. Die Struktur ist in Abbildung 4 dargestellt.



Galbonolid A: $R = OCH_3$
Galbonolid B: $R = CH_3$

Abb. 4: Struktur der Galbonolide

Die Summenformeln sind $C_{21}H_{32}O_6$ für Galbonolid A und für Galbonolid B $C_{21}H_{32}O_5$; die Molekulargewichte betragen 380 bzw. 364. Für Galbonolid A ist in Abbildung 5 ein UV-Spektrum und in Abbildung 6 ein IR-Spektrum wiedergegeben. Für die Überlassung der Spektren danke ich Herrn A. Mühlenfeld Universität Erlangen.
Galbonolid A und B haben sich mit den kürzlich isolierten Makroliden Rustmicin bzw. Neorustmicin A (TAKATSU et al., 1985; ABE et al., 1985) als identisch erwiesen.

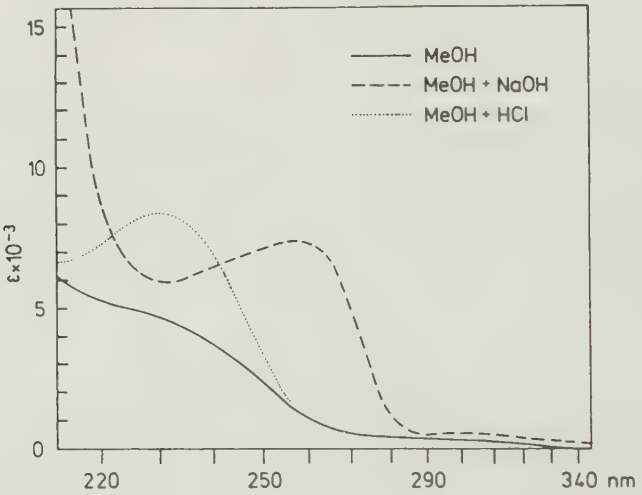


Abb. 5: UV-Spektrum von Galbonolid A

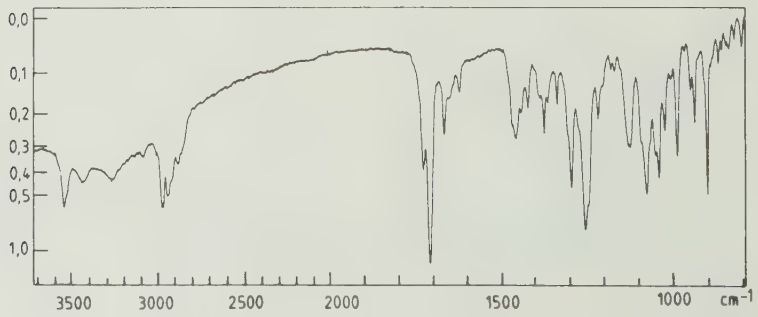


Abb. 6: IR-Spektrum von Galbonolid A in KBr

2. Produktionsoptimierung

2.1. Verbesserung des Stammes

2.1.1. Klonierung

Bei Schüttelkolbenversuchen mit TÜ 2253 fiel auf, daß die Produktion parallel beimpfter Kulturen stark variierte. Aus diesem Grund wurde versucht, durch Klonierung einen möglichst einheitlichen und gut produzierenden Stamm zu erhalten. Die maximale Produktion von 35 Klonen nach einem Klonierungsschritt ist in Abbildung 7 dargestellt, wobei die einzelnen Maxima in einem Zeitraum von 48-120 h Inkubation lagen. Von den drei Klonen mit der höchsten Produktion wurden in einem zweiten Klonierungsschritt wieder Einzelkolonien hergestellt. Bei 30 Klonen wurde die Produktion in Submerskultur untersucht. Das Ergebnis (Abb. 8) zeigte eine im Vergleich zum ersten Klonierungsschritt wesentlich einheitlichere Produktion, wobei auffallend war, daß alle Produktionsmaxima bei 48 h Inkubation lagen.

Bei Betrachtung der Morphologie der einzelnen Klone zeigte der Stamm nach dem ersten Klonierungsschritt eine Aufspaltung in Kolonien mit weißem und grauem Luftmycel, sowie segmentierte Mischformen. Auch nach dem zweiten Klonierungsschritt war eine derartige Aufspaltung zu beobachten. Von den morphologischen Unterschieden konnte jedoch keine Korrelation zur Antibiotika-Produktion hergestellt werden.

Untersuchungen des Wachstums in Submerskultur ließen erkennen, daß alle Kulturen, in denen die Klone in kleinen Pellets wuchsen, eine sehr gute Produktion zeigten, bei der Bildung von großen Pellets war die Produktion deutlich geringer. Eine weitere Korrelation war im Hinblick auf die Melanin-Produktion festzustellen, denn in Kulturen, in denen kein oder sehr wenig Melanin gebildet wurde, wurden auch keine Galbonolide synthetisiert.

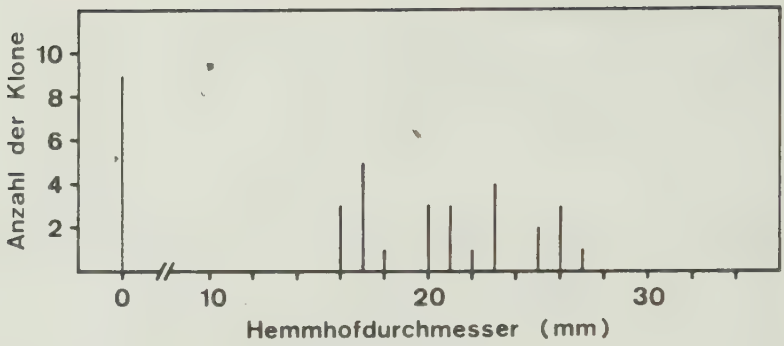


Abb. 7: Anzahl der Klone und ihre maximale Produktion nach der ersten Klonierung

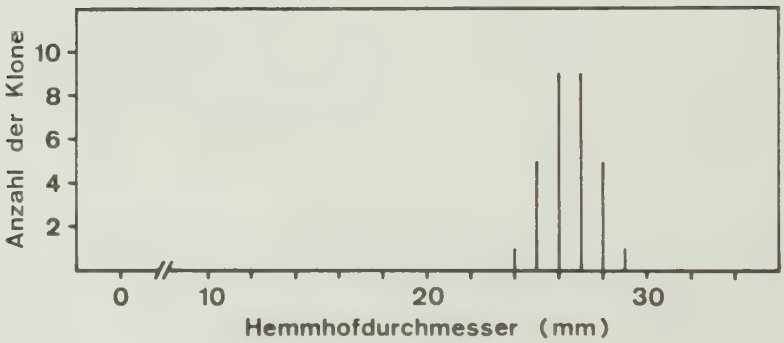


Abb. 8: Anzahl der Klone und ihre maximale Produktion nach der zweiten Klonierung

2.1.2. Mutagenese

Nach HOPWOOD (1970) ist bei einer Überlebensrate von 0.1 % die Wahrscheinlichkeit am größten, möglichst viele Mutanten mit nur einer Auxotrophie zu erhalten.
Für TÜ 2253 ergab sich eine Überlebensrate von 0.1 % nach einer 60-minütigen Mutagenese, die Absterbekurve ist in Abbildung 9 dargestellt.

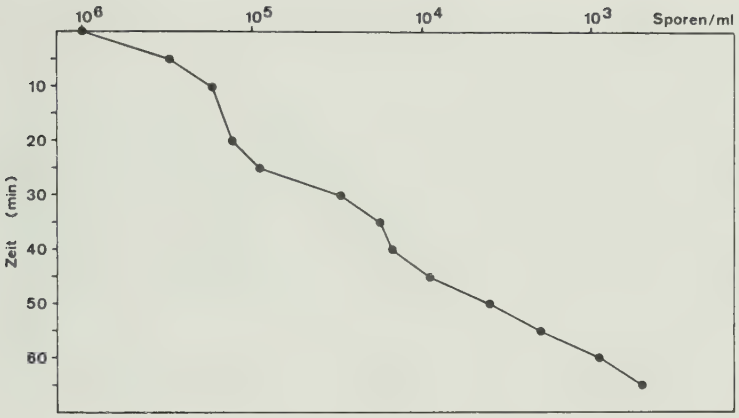


Abb. 9: Absterbekurve von Sporen des Stammes TÜ 2253 unter Einwirkung von 8-Methoxypsoralen und ultraviolettem Licht

Versuche bei TÜ 2253 durch Mutagenese höher produzierende Klone zu erhalten blieben erfolglos. Von 200 auf Produktion untersuchten Klonen zeigte keiner eine höhere Galbonolid-Bildung, und nur wenige erreichten das Niveau des Ausgangsstammes.
Ähnliche Beobachtungen wurden auch von GRÄFE (1981) gemacht, der eine Verringerung der Sekundärmetabolit-Produktion bei auxotrophen Defekten feststellte.

2.2. Variation chemischer und physikalischer Parameter

2.2.1. Optimierung des Nährmediums

Nach der von AUDEN et al. (1967) beschriebenen Methode der griechisch-lateinischen Quadrate wurde versucht, ein für die Produktion optimales Nährmedium zu finden. Hierbei können mit einer geringen Anzahl von Kombinationen jeweils drei Variationen der vier Faktoren (C-Quelle, organische und anorganische N-Quelle und eine Spurenelementelösung) untersucht werden. Der Nachteil dieser Methode ist, daß

eine Additivität der einzelnen Komponenten vorausgesetzt wird.

Die im Versuch verwendeten Komponenten, sowie die maximale Produktion bei den gewählten Kombinationen sind in Tabelle 2 dargestellt. Das Ergebnis war eine Nährlösung, die 2 % Malzextrakt, 1 % Sojamehl und 0.5 ml Spurenelementelösung enthielt. Im Vergleich zu dem bisher verwendeten Nährmedium 1 konnte jedoch keine höhere Produktion erzielt werden. Auch Kombinationen von Malzextrakt und Sojamehl in Konzen-

Tab. 2: Maximale Galbonolid-Produktion bei Kombination von Nährlösungskomponenten im griechisch-lateinischen Quadrat

Ansätze:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Summenwerte der Komponenten
C-Quelle:										
2% Glucose	x			x			x			61
2% Malzextrakt		x			x			x		78
2% Glycerin			x			x			x	62
organ. N-Quelle:										
1% Sojamehl	x	x	x							74
0.5% Hefeextrakt				x	x	x				68
0.5% Pepton							x	x	x	59
anorgan. N-Quelle:										
0.2% $(NH_4)_2SO_4$	x					x		x		64
0.2% $NaNO_3$		x		x					x	63
-			x		x		x			74
Spurenelementelsg.:										
1 ml	x				x				x	68
0.5 ml			x	x				x		75
-		x				x	x			58
Max. Produktion:	22	24	28	22	29	17	17	25	17	

Spurenelementelösung: $CoCl_2$ 100 mg/ml
$FeSO_4 * 7 H_2O$ 100 mg/ml
$MnCl_2 * 2 H_2O$ 100 mg/ml
$ZnSO_4 * 7 H_2O$ 100 mg/ml

trationen von 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 und 2.0 % ergaben ebenfalls keine Produktionssteigerung gegenüber Nährmedium 1.

Den Einfluß von Ammonium-Ionen auf die Produktion von Sekundärmetaboliten haben MARTIN und McDANIEL (1974) bei den Polyen-Makrolid-Antibiotika Candidin und Candihexin untersucht und festgestellt, daß die Antibiotika-Produktion infolge einer Stickstoff-Repression verringert wird. Nach OMURA et al. (1980) kann durch Zugabe von Magnesiumphosphat diese Stickstoff-Repression aufgehoben werden. Auch MASUMA et al. (1983) haben beobachtet, daß bei Zugabe eines natürlichen Zeoliten, der die Ammonium-Ionen im Medium abfing, die Produktion von Tylosin um das Dreifache gesteigert wurde.
Bei Verwendung von 1 % Magnesiumphosphat und Zugabe nach 24, 36 bzw. 48 h Inkubation konnte keine erhöhte Produktion der Galbonolide beobachtet werden.

Da Nährmedium 1 im Vergleich zu der Nährlösung, die mit der Methode der griechisch-lateinischen Quadrate gefunden wurde, weniger komplex und damit für die Aufarbeitung günstiger war, wurde Medium 1 als Produktionsmedium beibehalten.

2.2.2. Optimierung von Nährlösung 1

Nach RUTTLOFF et al. (1978) wurde die quantitative Zusammensetzung von Medium 1 nach der Box-Wilson-Methode optimiert. Glucose wurde in den Konzentrationen von 1, 2, 3, 4 und 5 % eingesetzt, Malzextrakt mit 2, 3, 5 und 8 %. Die Resultate waren jedoch negativ. Im Vergleich zu Medium 1, in dem Glucose zu 0.8 % und Malzextrakt zu 1 % enthalten war, konnte keine signifikante Produktionssteigerung erzielt werden. Wurde Glucose in hohen Konzentrationen (> 2 %) eingesetzt, so war eine drastische Verringerung der Produktion zu beobachten; Malzextrakt in hohen Konzentrationen hingegen zeigte keinen derartigen Effekt.

2.2.3. Kulturführung mit konstanten pH-Werten

In Submerskulturen mit TÜ 2253 sank der pH-Wert zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase auf Werte zwischen 4.5 und 5.0 ab; während der logarithmischen Phase stieg der pH-Wert wieder an und erreichte bei beginnender Lyse der Zellen Werte zwischen 7.0 und 7.5. Die Tatsache, daß die Galbonolide bei alkalischen pH-Werten nicht sehr stabil sind und die Beobachtung, daß das Maximum der Produktion stets bei einem pH-Wert von ca. 6.5 lag, gab Anlaß zu der Vermutung, eine weitere Erhöhung der biologischen Aktivität in der Submerskultur könnte aufgrund des alkalischen

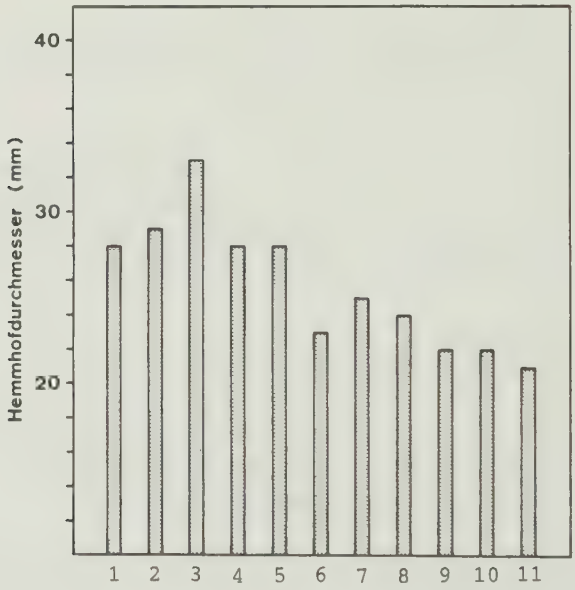


Abb. 10: Einfluß des pH-Werts auf die maximale Galbonolid-Produktion

1: Kontrolle; 2: MES pH 5.5; 3: MES pH 6.0; 4: MES pH 6.5; 5: TES pH 7.0; 6: MOPS pH 7.0; 7: BES pH 7.0; 8: TES pH 7.5; 9: HEPES pH 7.5; 10: TES pH 8.0; 11: TRICIN pH 8.0

pH-Werts limitiert sein. Deshalb wurde unter Verwendung von nicht metabolisierbaren Puffersubstanzen (AHARONOWITZ & DEMAIN, 1977) der Produktionsverlauf bei konstant gehaltenen pH-Werten in Schüttelkulturen verfolgt.
Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, konnten die besten Syntheseleistungen mit pH-Werten von 5.5 und 6.0 erzielt werden. Die Maximalwerte der Kontrolle lagen bei 1.75 mg/l, bei pH 5.5 wurden 2.1 mg/l und bei pH 6.0 4.2 mg/l erreicht. Die Produktion bei einem konstanten pH-Wert von 6.5 entsprach der von Kulturen ohne pH-Regelung (Kontrolle), höhere pH-Werte führten zu einer drastischen Verringerung der Produktion.

2.2.4. Einfluß der Inkubationstemperatur

Abbildung 11 zeigt die jeweils maximale Galbonolid-Produktion bei den gewählten Inkubationstemperaturen eines Temperatur-Gradienten. Mit Abnahme der Inkubationstemperatur stieg die Galbonolidproduktion an und erreichte in einem Bereich zwischen 19 und 20°C den maximalen Wert von 3.5 mg/l. Im Vergleich dazu wurden bei 27°C nur 0.7 mg/l Galbonolid gebildet.

2.3. Verfütterungsversuche

Da der Einfluß von Supplementen in chemisch definiertem Medium und unter wachstumslimitierten Bedingungen genauer untersucht werden kann, wurde versucht ein "resting-cell"-System aufzustellen. Bei Verwendung von Medium 3 als "resting-cell"-Medium zeigte TÜ 2253 keine Produktion; auch bei Einsatz von 10 mM Asparagin, 10 mM Isoleucin und 10 mM bzw. 50 mM Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle war keine Galbonolid-Bildung zu beobachten. Weiterhin wurde die Kohlenstoffquelle mit jeweils 2 % Mannit, Stärke bzw. Glycerin variiert und der Einfluß des Alters der Vorkultur (24, 36, 48, 60 und 72 h) untersucht; hierbei konnten ebenfalls keine Galbonolide nachgewiesen werden.

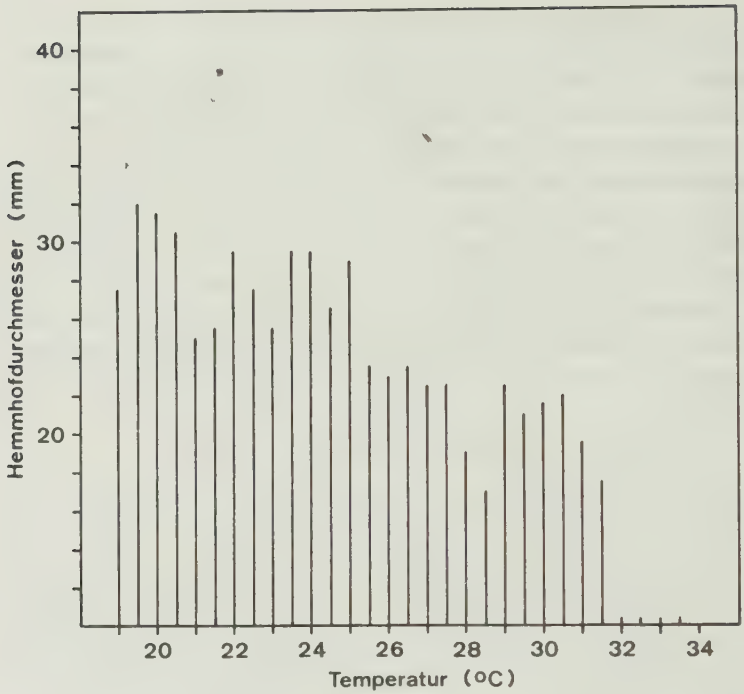


Abb. 11: Einfluß der Temperatur auf die maximale Galbonolid-Produktion

In Nährlösungsversuchen mit Minimalmedien (Medium 4, 5, 6 und 7) war das Wachstum von TÜ 2253 deutlich geringer als in komplexem Medium, und es setzte in diesen Kulturen auch keine Galbonolid-Bildung ein. Aufgrund dieser Versuche wurden im folgenden alle Verfütterungsversuche auf der Basis der komplexen Nahrlösung 1 durchgeführt.

2.3.1. Einfluß von Aminosäuren

Die Beobachtung verschiedener Autoren (ROBBERS & FLOSS, 1970; DEMAIN & INAMINE, 1970; KURTH, 1981), daß durch Zugabe von Aminosäuren während der Wachstumsphase die Produktion von Sekundärmetaboliten gesteigert werden kann,

gab Anlaß, auch bei TÜ 2253 den Einfluß von Aminosäuren auf die Produktion der Galbonolide zu untersuchen.
Mit den verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Isoleucin, sowie den aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin wurde Medium 1 supplementiert. Eine stimulatorische Wirkung war nur bei Zugabe von Isoleucin (1 mM) zu beobachten, was zu einer Produktionserhöhung von 1.75 mg/l auf 2.5 mg/l führte. Die maximale Produktion der einzelnen Ansätze ist in Abbildung 12 wiedergegeben.

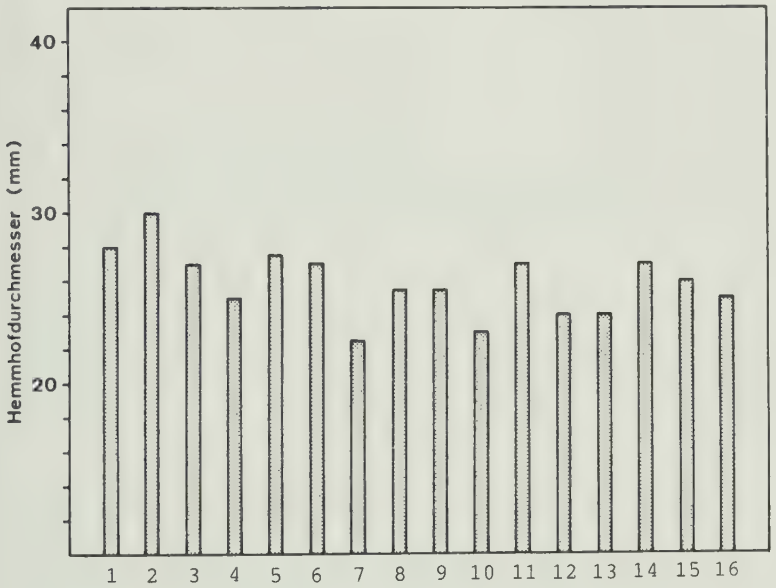


Abb. 12: Maximale Galbonolid-Produktion bei Zugabe von Aminosäuren

1: Kontrolle;
2: Isoleucin 1 mM;
3: Isoleucin 5 mM;
4: Isoleucin 10 mM;
5: Valin 1 mM;
6: Valin 5 mM;
7: Valin 10 mM;
8: Tryptophan 1 mM;
9: Tryptophan 5 mM;
10: Tryptophan 10 mM;
11: Tyrosin 1 mM;
12: Tyrosin 5 mM;
13: Tyrosin 10 mM;
14: Phenylalanin 1 mM;
15: Phenylalanin 5 mM;
16: Phenylalanin 10 mM

Eine Variation des Zeitpunkts der Zugabe (12, 24, 36 oder 48 h) hatte keinen positiven Effekt auf die Produktion (Ergebnisse nicht dargestellt).

2.3.2. Einfluß von Carbonsäuren und Alkoholen

FRIEDMAN et al. (1964) haben gezeigt, daß 2-Methylmalonat eine effektive Vorstufe für die Biogenese von Erythronolid A darstellt.
Eine mögliche Stimulation der Galbonolid-Produktion durch verschiedene Fettsäuren, Ethanol, Propanol, Butanol und Glycerin wurde in Nährlösungsversuchen mit TÜ 2253 untersucht. Die Zugabe der Supplemente zu Medium 1 mit Ausnahme von Ethanol, Propanol und Butanol sowie die Einstellung des pH-Werts auf 7.3 erfolgte vor der Sterilisation. Die Ergebnisse (Abbildung 13 und 14) zeigen, das Supplementation mit 1 mM Phenylbrenztraubensäure, 5 mM Acetat, 1 mM Pyruvat und 3 mM Methylmalonsäure zu einer höheren Produktion führten, wobei mit 3 mM Methylmalonsäure eine Ausbeute von 3.2 mg/l erzielt werden konnte. Eine leichte Verbesserung der Galbonolid-Bildung war bei Zusatz von 1 mM Succinat zu beobachten, während Isobuttersäure, Methylbuttersäure, Ethanol, Propanol, Butanol und Glycerin die Produktbildung stark verringerten.

2.3.3. Einfluß von Glycerinphosphatiden und Vitamin B_{12}

Da durch Sterilisation des Mediums eine mögliche Wirkung des hitzelabilen Vitamins B_{12} im Hinblick auf die Galbonolid-Synthese verringert werden kann, wurde das Vitamin in steril-filtrierter Lösung dem Nährmedium zugegeben. Der Einfluß verschiedener Glycerinphosphatide wurde durch Zugabe von Sojalecithin und Phosphatidylcholin der Firmen Nattermann und Sigma untersucht. Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, zeigte Vitamin B_{12} keinen produktionsfördernden Effekt. Der Zusatz von Glycerinphosphatiden führte jedoch mit 3 mg/l zu einer deutlich höheren Produktion.

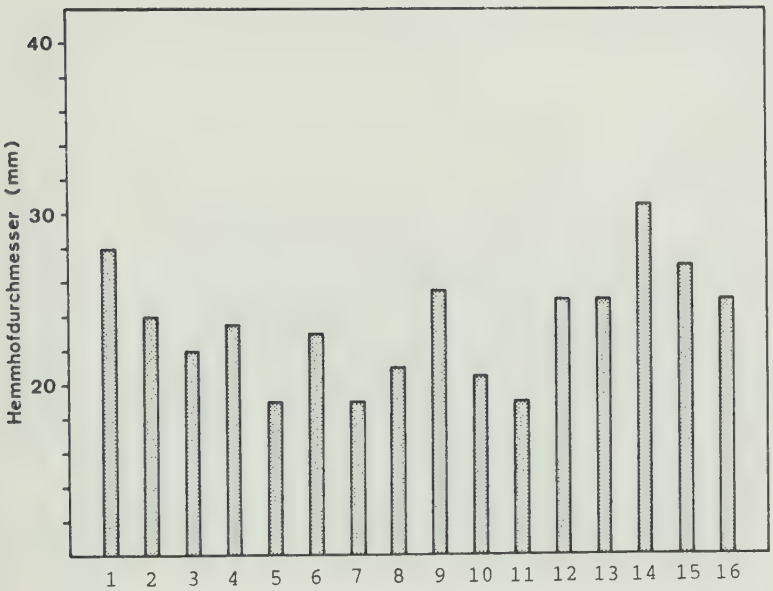


Abb. 13: Maximale Galbonolid-Produktion bei Zugabe von Alkoholen und Carbonsäuren

1: Kontrolle;
2: Ethanol 50 mM;
3: Ethanol 150 mM;
4: Propanol 50 mM;
5: Propanol 150 mM;
6: Butanol 50 mM;
7: Butanol 150 mM;
8: Glycerin 1 %;
9: Glycerin 3 %;
10: Isobuttersäure 1 mM;
11: Isobuttersäure 3 mM;
12: Methylbuttersäure 1 mM;
13: Methylbuttersäure 3 mM;
14: Phenylbrenztraubensäure 1 mM;
15: Phenylbrenztraubensäure 5 mM;
16: Phenylbrenztraubensäure 10 mM

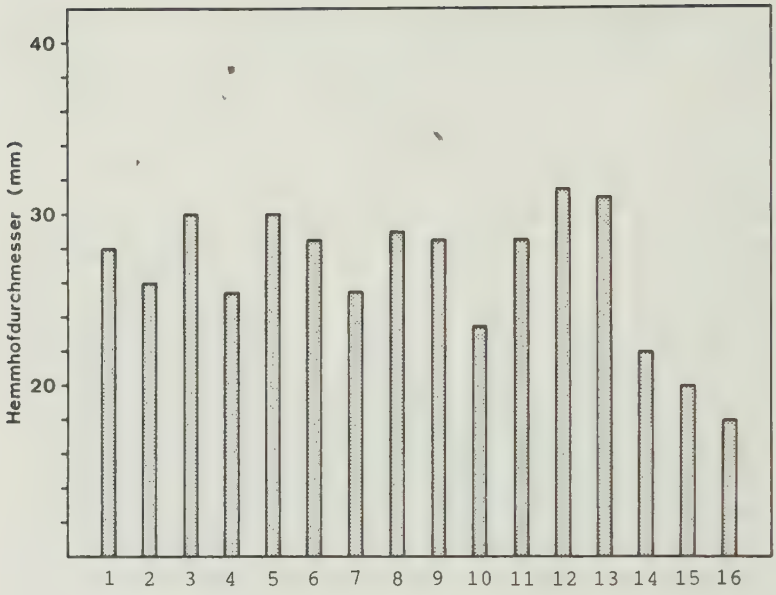


Abb. 14: Maximale Galbonolid-Produktion bei Zugabe von Carbonsäuren

1: Kontrolle;
2: Acetat 1 mM;
3: Acetat 5 mM;
5: Pyruvat 1 mM;
6: Pyruvat 5 mM;
7: Pyruvat 10 mM;
8: Succinat 1 mM;
9: Succinat 5 mM;
10: Succinat 10 mM;
11: Methylmalonsäure 1 mM;
12: Methylmalonsäure 3 mM;
13: Methylmalonsäure 10 mM;
14: Ethylmalonsäure 1 mM;
15: Ethylmalonsäure 3 mM;
16: Ethylmalonsäure 10 mM

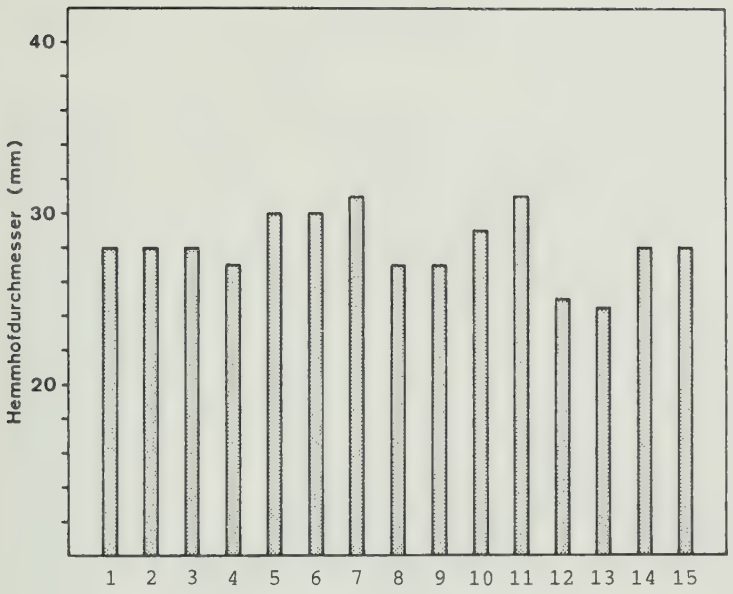


Abb. 15: Maximale Galbonolid-Produktion bei Zugabe von Glycerinphosphatiden und Vitamin B_{12}

1: Kontrolle;
2: Sojalecithin (Nat) 0.1 %;
3: Sojalecithin (Nat) 1.0 %;
4: Sojalecithin (Nat) 2.0 %;
5: Sojalecithin (Nat) 3.0 %;
6: Phosphatidylcholin (Nat) 0.1 %;
7: Phosphatidylcholin (Nat) 1.0 %;
8: Phosphatidylcholin (Nat) 2.0 %;
9: Phosphatidylcholin (Nat) 3.0 %;
10: Phosphatidylcholin (Sigma) 0.1 %;
11: Phosphatidylcholin (Sigma) 1.0 %;
12: Phosphatidylcholin (Sigma) 2.0 %;
13: Phosphatidylcholin (Sigma) 3.0 %;
14: Vitamin B_{12} 0.1 %;
15: Vitamin B_{12} 0.01 %

2.3.4. Kombination von Supplementen

Da mit verschiedenen Zusätzen zu Medium 1 eine deutliche Produktionssteigerung erzielt worden war, wurde anschließend ermittelt, ob durch Kombination dieser Supplemente eine noch bessere Syntheseleistung erreicht werden könnte. Um alle 7 Substanzen, die eine signifikante Produktionssteigerung bewirkt haben, in nur 3 Konzentrationen miteinander zu kombinieren, wäre die Galbonolid-Bildung in $7^3 = 343$ verschiedenen Ansätzen zu untersuchen. Schließt man auch noch alle Kombinationen mit weniger als 7 Komponenten mit ein, käme man auf über 1000 Ansätze. Da dies zu untersuchen aus zeitlichen Gründen nicht möglich war, wurden ausgehend von 3 Komponenten in 2 bzw. 3 Konzentrationen verschiedene Kombinationen ausgewählt.
Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, ergab eine Kombination der Supplemente keinen additiven Effekt hinsichtlich der Galbonolid-Produktion, mit Ausnahme der Nährlösung, die mit 1 mM Isoleucin, 3 mM Methylmalonsäure und 1 % Phosphatidylcholin supplementiert worden war. Hier konnte die Galbonolid-Bildung im Vergleich zu Ansätzen mit Zugabe einzelner Komponenten von 3.2 mg/l auf 4.2 mg/l nochmals gesteigert werden.

2.4. Fermentation

2.4.1. Einfluß der Belüftung

Durch Variation der Drehzahl des Blattrührers und der Luftzufuhr wurden im 10 l-Fermenter die besten Bedingungen für eine möglichst hohe Produktion ermittelt. In Abbildung 16 sind Produktion und Sauerstoffpartialdruck von Fermentationen mit Rührerdrehzahlen von 200, 300 und 500 Upm dargestellt. Bei einer Drehzahl von 200 Upm ist offensichtlich der mangelnde Sauerstoffeintrag ins Medium ein für die Produktion limitierender Faktor. Zudem wuchs der Stamm in sehr großen Pellets, wodurch eine gute Substrat- und Sauerstoffversorgung im Innern der Pellets möglicher-

Tab. 3: Maximale Galbonolid-Produktion bei Zugabe von Supplementen in Kombination

Supplemente	Produktion in mm Hemmhofdurchmesser
- (Kontrollansatz)	28
Isoleucin 1 mM	30
Isoleucin 3 mM	29
Methylmalonsäure 1 mM	28.5
Methylmalonsäure 3 mM	31.5
Methylmalonsäure 10 mM	31
Phosphatidylcholin (Nat) 1%	30.5
Phosphatidylcholin (Nat) 2%	27.5
Isoleucin 1 mM, Methylmalonsäure 1 mM	30
Isoleucin 1 mM, Methylmalonsäure 3 mM	30
Isoleucin 1 mM, Methylmalonsäure 10 mM	27
Isoleucin 3 mM, Methylmalonsäure 1 mM	26
Isoleucin 3 mM, Methylmalonsäure 3 mM	26
Isoleucin 3 mM, Methylmalonsäure 10 mM	24
Isoleucin 1 mM, Phosphatidylcholin 1%	30
Isoleucin 1 mM, Phosphatidylcholin 2%	29
Isoleucin 3 mM, Phosphatidylcholin 1%	30
Isoleucin 3 mM, Phosphatidylcholin 2%	29
Isoleucin 1 mM, Methylmalonsäure 3 mM, Phosphatidylcholin 1%	33

weise nicht mehr gewährleistet war (HASENBÖHLER, 1978). Eine deutliche Produktionssteigerung konnte mit einer Drehzahl von 300 Upm erzielt werden, da der Sauerstoffpartialdruck mit einem Minimalwert von 57 % nicht limitierend war. Gleichzeitig gestattete das Wachstum in sehr kleinen Pellets eine gleichmäßig gute Substrat- und Sauerstoffversorgung. Eine Rührerdrehzahl von 500 upm führte zwar ebenfalls nicht zu einer Sauerstoff-Limitierung, doch war hier

vermutlich der Einfluß von Scherkräften die Ursache für eine stark verringerte Produktion.

Bei einer Luftzufuhr von 0.6 vvm bzw. 1.0 vvm waren keine Unterschiede hinsichtlich der Produktionshöhe, des Zeitpunkts des Produktionsmaximums und der Menge des gelösten Sauerstoffs festzustellen.

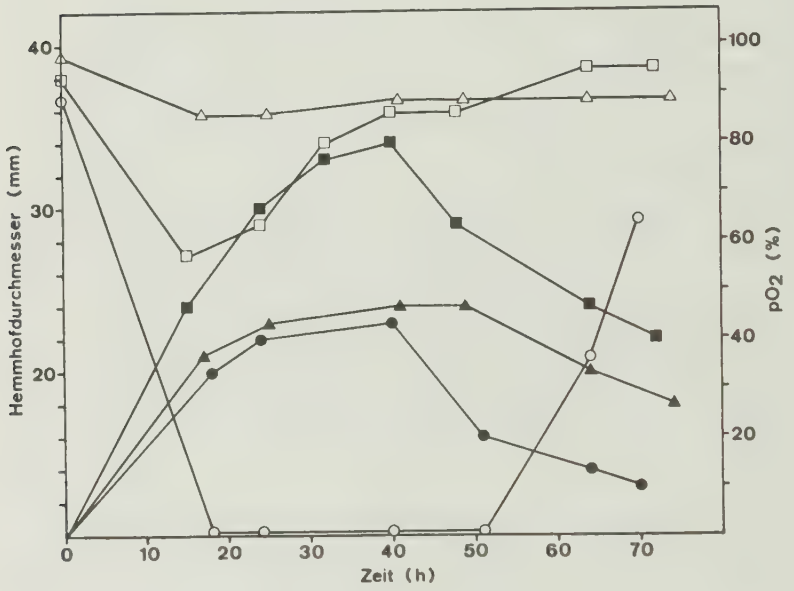


Abb. 16: Verlauf von Galbonolid-Produktion und Sauerstoffpartialdruck bei verschiedenen Drehzahlen des Blattrührers, 27°C und 0.6 vvm:

Produktion: ●— 200 Upm pO2: —○— 200 Upm
■— 300 Upm —□— 300 Upm
▲— 500 Upm —△— 500 Upm

2.4.2. pH-statische Fermentation

Wie bei Schüttelkolbenversuchen (vgl. 2.2.3.) festgestellt worden war, führte eine Begrenzung des pH-Wertes auf 6.0 zu einer deutlich besseren Produktion. Im Fermenter dagegen hatte die pH-Begrenzung auf 6.0 im Vergleich zur ungeregelten Fermentation eine geringere Galbonolid-Bildung zur Folge. Wurde der pH-Wert bei der Fermentation jedoch erst beim Wiederanstieg nach ca. 30 h auf 6.0 begrenzt, so wurde dieselbe Produktionshöhe erreicht wie bei der ungeregelten Fermentation. Wie aus Abbildung 17 hervorgeht,

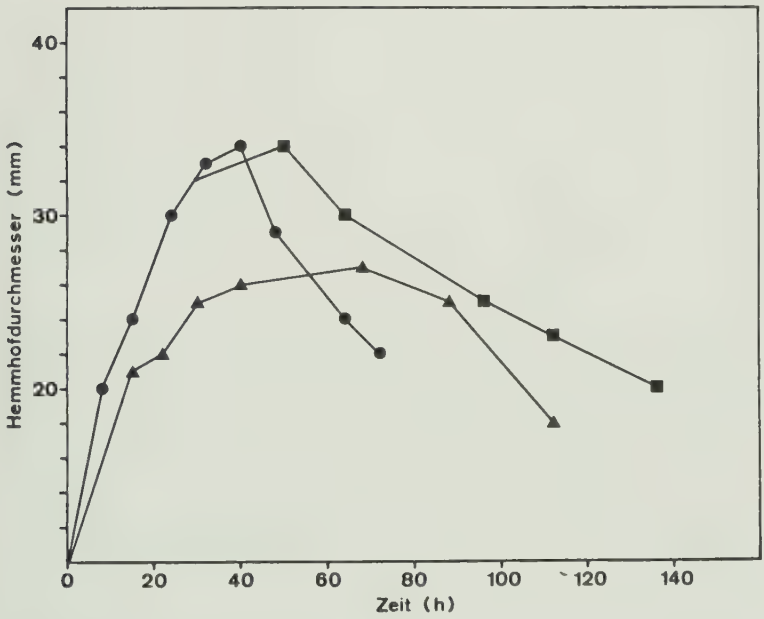


Abb. 17: Verlauf der Galbonolid-Produktion ohne und mit pH-Begrenzung bei 27°C, 300 Upm und 0.6 vvm:
—●— ungeregelte Fermentation
—▲— pH-Begrenzung auf pH 6.0 mit Beginn der Fermentation
—■— pH-Begrenzung auf pH 6.0 nach 30 h Inkubation

konnte eine pH-Regelung nach 30 h die Produktionsphase um 10 h verlängern und einen raschen Abfall der biologischen Aktivität nach Erreichen des Maximums verhindern.

2.4.3. Feeding-Fermentation

MARTIN & McDANIEL (1974) haben gezeigt, daß sich durch langsames Zufüttern von Glucose die Produktion der Makrolide Candidin und Candihexin stimulieren läßt. Dies ist eine wirksame Methode um bei Antibiotika-Produzenten, die einer C-Katabolit-Repression unterliegen, die Substratkonzentration unterhalb des kritischen Schwellenwertes zu begrenzen (DEMAIN, 1972). Die Art der Regelung kann zum Beispiel über den Sauerstoff-Partialdruck erfolgen, der in direktem Zusammenhang mit der Stoffwechselaktivität des Produzentenstammes steht. Bei stoffwechselaktiven Zellen mit einem großen Glucose-Umsatz sinkt der pO_2 ab, bei geringerer Stoffwechselaktivität, wie es beispielsweise am Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Fall ist, in der auch nur noch sehr wenig Glucose verbraucht wird, steigt der pO_2 wieder an.

Eine weitere Möglichkeit der Regelung besteht in der Begrenzung des pH-Wertes, der ebenfalls von der Stoffwechselaktivität abhängig ist, insofern, als durch den Abbau der Glucose im Medium organische Säuren von dem Organismus teilweise ausgeschieden werden, die eine Absenkung des pH-Werts verursachen. Nach völligem Verbrauch der Glucose und anschließender Metabolisierung der Säuren steigt der pH-Wert wieder an.

Bei Fermentationen von TÜ 2253 mit einer Belüftungsrate von 0.6 vvm und einer Rührerdrehzahl von 300 Upm war nach ca. 25 h Inkubation Glucose in der Nährlösung nicht mehr nachzuweisen. Da Glucose sich aber als beste C-Quelle für die Galbonolid-Produktion erwies (FAUTH, 1984), lag der Schluß nahe, daß die Erschöpfung dieses Substrats die Produktion limitierte. Andererseits haben die Ergebnisse

von Schüttelkolbenversuchen gezeigt (vgl. 2.2.2), daß hohe Glucosekonzentrationen zu einer drastischen Verringerung der Galbonolid-Bildung führen, und der Stamm somit einer C-Katabolit-Repression unterliegt. Aufgrunddessen wurde versucht durch langsames Glucose-feeding das Substrat für die Produktion in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen, gleichzeitig aber unterhalb des für die C-Katabolit-Repression kritischen Werts zu bleiben.

Eine Regelung der feeding-Rate über den pH-Wert erschien bei TÜ 2253 nicht sinnvoll, da der Zeitpunkt, zu dem die Glucose verbraucht war, in der logarithmischen Wachstumsphase lag. Denn durch vermehrtes Wachstum nimmt die Pufferkapazität der Kultur zu, sodaß die zugeführte Glucosemenge nicht dem tatsächlichen Bedarf entsprechen würde.

Eine Regelung über den Sauerstoffpartialdruck war ebenfalls kritisch, da durch stärkeres Wachstum infolge weiterer Glucosezufuhr die Luftdüsen am Boden des Fermenters vom Mycel teilweise zugewachsen waren. Durch den verringerten Sauerstoffeintrag ins Medium würde bei einer Regelung über den Sauerstoffpartialdruck mehr Glucose zugeführt werden als tatsächlich verbraucht würde, somit bestünde wieder die Gefahr einer C-Katabolit-Repression. Bei TÜ 2253 wurde deshalb die feeding-Rate durch enzymatische Glucosebestimmung und anschließender Berechnung des Verbrauchs ermittelt.

In Abbildung 18 ist der Verlauf einer Fermentation mit Glucose-feeding wiedergegeben. Nach 25 h wurde Glucose mit einer Rate von 2.5 g/h zugeführt, wodurch die Glucosekonzentration über einen Zeitraum von 25 h mit 2-2.5 g/l in etwa konstant blieb. Nach 64 h Inkubation mußte die feeding-Rate auf 6 g Glucose/h erhöht werden, da infolge stärkeren Wachstums der Verbrauch gestiegen war. Das Produktionsmaximum wurde nach 40 h Inkubation erreicht und entsprach sowohl zeitlich als auch quantitativ dem Maximalwert in Fermentationen ohne Glucose-feeding. Bei der

feeding-Fermentation nahm die biologische Aktivität jedoch anschließend nur wenig ab und blieb bis zum Ende der Fermentation auf einem relativ hohen Niveau. Durch ständige Zufuhr und Metabolisierung der Glucose stieg der pH-Wert nur sehr langsam an und hatte am Ende der Fermentation gerade 6.0 erreicht. Das rasche Absinken des Sauerstoffpartialdrucks ist einerseits auf das verstärkte Wachstum und andererseits auf eine eingeschränkte Belüftung infolge von Mycelbewuchs an den Luftdüsen zurückzuführen.

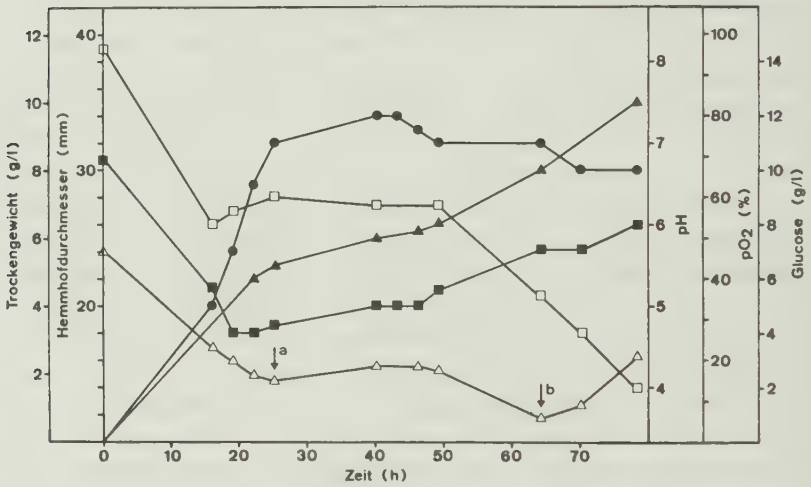


Abb. 18: 10 l Fermentation mit Glucose-feeding bei 27 °C, 300 Upm und 0.6 vvm:
—●— Produktion; —▲— Trockengewicht;
—■— pH; —□— pO2; —△— Glucose
↓ : Glucose-feeding, a: 2.5 g/h, b: 6 g/h

2.4.4. Temperatur-Shift

Ausgehend von den Versuchen im Temperaturgradienten mit Inkubation von TÜ 2253 bei verschiedenen Temperaturen, wurde in Schüttelkolben ein Temperatur-Shift durchgeführt,

wobei die Vorkultur bei 27°C gewachsen war und die Erlenmeyer-Kolben dann bei 19.5°C inkubiert wurden. Das Ergebnis zeigte eine verzögerte, aber deutlich bessere Galbonolid-Produktion der Kulturen, die bei 19.5°C gewachsen waren gegenüber den Kolben mit einer Inkubationstemperatur von 27°C. Die Übertragbarkeit dieses Temperatureffekts wurde anschließend im Fermenter untersucht und geprüft, ob - in Analogie zu den Schüttelkolbenversuchen - ebenfalls eine höhere Galbonolid-Produktion zu erzielen ist. Mit einer Vorkultur, die bei 27°C gewachsen war, wurde der Bioreaktor beimpft und bei 19.5°C betrieben. Die Nährlösung enthielt zusätzlich noch 1 mM Isoleucin, 3 mM Methylmalonsäure und 1 % Phosphatidylcholin, da diese Kombination von Supplementen einen produktionsstimulierenden Effekt verursacht hatte (vgl. 2.3.4.). Wie aus Abbildung 19 ersichtlich ist, beginnt die Antibiotika-Produktion erst

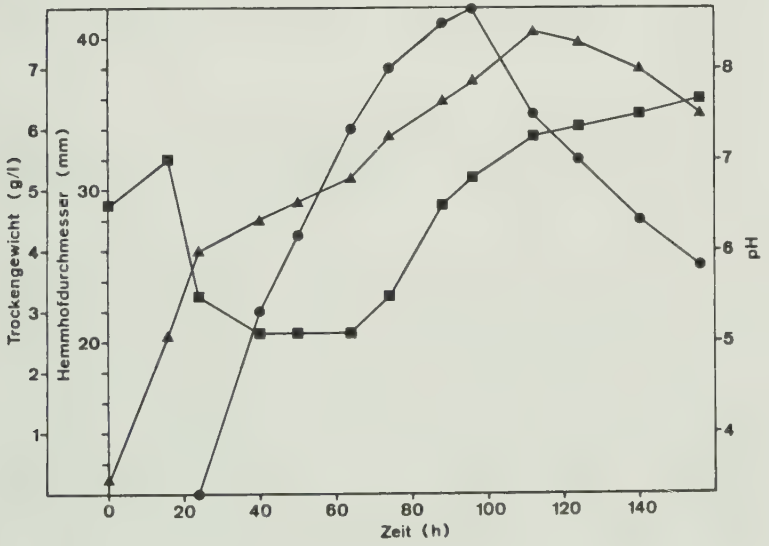


Abb. 19: 10 l Fermentation nach Temperatur-Shift von 27°C auf 19.5°C bei 300 Upm und 0.6 vvm:
—●— Aktivität; —▲— Trockengewicht; —■— pH

nach 24 h Inkubation, der Verlauf des pH-Wertes ist in gleicher Weise verzögert. Das Produktionsmaximum wird erst nach 96 h erreicht, es liegt jedoch mit 42 mm Hemmhofdurchmesser deutlich höher als bei der Fermentationstemperatur von 27°C, bei der maximal 34 mm Hemmhofdurchmesser erzielt worden waren. Aus Berechnungen mittels der Eichkurve von Galbonolid A ergab sich somit eine Produktionssteigerung von 5 mg/l auf 20 mg/l.

3. Untersuchungen zur Wirkungsweise

3.1. Wirkungsspektrum

3.1.1. Mikroorganismen

Die Auswahl von verschiedenen Bakterien, Hefen und höheren Pilzen hatte zum Ziel, ein möglichst breites Spektrum im Hinblick auf die taxonomische Zuordnung abzudecken und damit Ansatzpunkte für die Untersuchung der Wirkungsweise zu erhalten.
Tabelle 4 gibt einen Überblick über die geprüften Mikroorganismen und ihre minimalen Hemmkonzentrationen, wobei der MHK-Wert der Konzentration entspricht, bei der gerade noch ein Hemmhof zu erkennen war. Sämtliche unter II.3.2. aufgeführten Bakterien waren bei einer Höchstkonzentration von 1 mg/ml gegen Galbonolid A und B unempfindlich. Die antibiotische Aktivität erstreckte sich ausschließlich auf Pilze, wobei die untersuchten Organismen aus der Klasse der Zygomyceten insensitiv waren. Bei der Klasse der Oomyceten konnte auch nur eine sehr schwache Hemmwirkung festgestellt werden. Eine sehr gute antifungische Wirkung zeigten die Galbonolide gegenüber echten Hefen und Fungi imperfecti, wobei die Wirksamkeit von Galbonolid A in etwa um den Faktor 100 größer war als die von Galbonolid B.

Tab. 4: Biologische Aktivität der Galbonolide gegen verschiedene Pilze

Organismen	Test-methode	Galbonolid (10 ui/Rondelle) A (ug/ml)	Galbonolid (10 ui/Rondelle) B (ug/ml)
Oomycetes:			
Phytophthora palmivora	K	-	-
Phytium debaryanum	K	-	-
Saprolegnia asterophora	K	1000	1000
Zygomycetes:			
Mucor hiemalis	S	-	-
Mucor miehei	S	-	-
Mucor racemosus	S	-	-
Ascomycetes und Deuteromycetes:			
Alternaria kikuchiana	K	-	-
Arthrinium phaeosporum	K	-	-
Aspergillus fumigatus	S	-	-
Aspergillus viride-mutans	S	-	-
Botrytis cinerea	K	0.1	10
Byssoclamis nivea	S	-	-
Candida albicans	V	3	300
Candida guilliermondii	V	-	-
Candida vulgaris	V	10	1000
Cladosporium herbarum	S	0.1	10
Claviceps viridis	K	-	-
Colletotrichum acutaxum	S	-	-
Dipodascus magnuseii	V	3	100
Endomyces magnuseii	V	1	30

Organismen	Test-methode	Galbonolid (10 ul/Rondelle) A (ug/ml)	B (ug/ml)
Fusarium solani	S	10	300
Hansenula anomala	V	0.3	30
Microsporum canis	K	-	-
Mycothypha africana	S	-	-
Neurospora crassa	S	-	-
Paecilomyces variotii	S	300	300
Penicillium notatum	S	300	-
Penicillium puberulum	S	1000	-
Phoma spec.	K	-	300
Pichia farinosa	V	0.1	3
Pyricularia oryzae	K	-	-
Rhizoctonia solani	K	0.3	10
Rhodotorula rubra	V	0.05	5
Saccharomyces cerevisiae	V	3	1000
Sordaria macrospora	K	300	300
Talaromyces flavus	K	30	300
Trichophyton mentagrophytes	S	-	-
Wingea robertsii	V	10	-
Yarrowia lipolytica	V	10	-
Basidiomycetes:			
Coprinus cinereus	S	30	1000
Ustilago maydis	S	10	10

-: keine Hemmung bei einer Konzentration von 1 mg/ml

Testmethoden (K, S, V) siehe unter II.8.1.

Zwischen ontogenetischen Merkmalen einer taxonomischen Gruppe bzw. chemischen Charakteristika, wie beispielweise die Zusammensetzung der Zellwand, und der antifungischen Aktivität der Galbonolide konnte jedoch keine Korrelation gezeigt werden.

3.1.2. Protozoen

OMURA et al. (1983) beschrieben eine Aktivität gegen Protozoen bei Virustomycin A, einem Makrolid-Antibiotikum mit einem 18-gliedrigen Lacton-Ring, das ebenfalls zur Gruppe der ungewöhnlichen Makrolide gehört. Die minimale Hemmkonzentration von Virustomycin A bei Trichomonas foetus betrug 1.6 ug/l.
Untersuchungen mit Galbonolid A bezüglich einer Anti-Protozoen-Aktivität zeigten keine Beeinflußung der Vitalität von Paramecium caudatum über einen Zeitraum von 48 h bei einer Endkonzentration von 10 ug/ml Galbonolid A.

3.1.3. Nematoden

Mit dem von BRENNER (1974) entwickelten Screening-Modell für Substanzen mit Anti-Nematoden-Aktivität wurde untersucht, ob die Galbonolide eine Wirkung gegen Nematoden zeigen.
Bei Inkubation von Caenorhabditis elegans unter Zusatz von Galbonolid A konnte in den Konzentrationen von 20, 40 und 50 ug/ml kein Einfluß auf die Beweglichkeit und die Vermehrung der Würmer im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden, während Avermectin B_1 als Vergleichssubstanz eine Immobilisierung von Caenorhabditis elegans noch in einer Konzentration von 1 ng/ml verursachte.

Eine Hemmwirkung auf Nematoden besitzen Substanzen aus der Gruppe der Avermectine, die zu den ungewöhnlichen Makrolid-Antibiotika zu zählen sind. Die Avermectine interferieren mit Neurorezeptoren, indem sie die Reizübertragung zwischen Interneuron und Motoneuron durch Bindung an den γ-Aminobuttersäure-Rezeptor blockieren (KASS et al.,1980).

3.1.4. Einfluß auf TÜ 2253

Die Ergebnisse der Versuche zur Sporenauskeimung von TÜ 2253 lieferten keine Hinweise, daß Galbonolid A das Auskeimen der Sporen in irgendeiner Art und Weise beeinflußen könnte. Der überwiegende Teil der Sporen war nach 3 Tagen ausgekeimt; bei ca. 14 % der Gesamtzahl trat eine Verzögerung von 1-2 Tagen auf, wobei der Anteil der verzögert ausgekeimten Sporen unter Einfluß von Galbonolid A dem der Kontrolle entsprach. Die Ergebnisse der Platten mit Galbonolid-Zusatz stimmten sowohl quantitativ als auch bezüglich der Morphologie mit den Resultaten der Kontrolle überein.

3.2. Wirkungsart

3.2.1. Reihenverdünnungstest

Mit dem Reihenverdünnungstest wurde die minimale Hemmkonzentration der Galbonolide für Rhodotorula rubra in Medium 15 ermittelt.
Die Werte betrugen 0,05 ug/ml für Galbonolid A und 5 ug/ml für Galbonolid B. Nach Auswaschen der Antibiotika konnte bei diesen Konzentrationen kein weiteres Wachstum des Testkeims beobachtet werden, das bedeutet, daß die biologische Wirkung der Galbonolide fungiziden Charakter hat.

3.2.2. Abhängigkeit von der Wachstumsphase

Durch Zugabe von Galbonolid A zu verschiedenen Zeitpunkten einer wachsenden Kultur von Rhodotorula rubra sollte untersucht werden, in welcher Art und Weise die Wirkung des Antibiotikums von der jeweiligen Wachstumsphase und den damit verbundenen spezifischen Stoffwechselvorgängen abhängt. Bei Inkubation des Testkeims bei den unter II.8.6. beschriebenen Bedingungen war in der logarithmischen Wachstumsphase bis 2.5 h nach Zugabe kein Einfluß von Galbonolid A feststellbar. Nach 2.5 - 3.0 h war bei photome-

trischer Messung keine weitere Zunahme der Gesamtkeimzahl zu erkennen; die Bestimmung der Lebendkeimzahl zeigte eine fungizide Wirkung. Wurde Galbonolid A in der lag-Phase zugegeben, so trat die Wirkung erst nach 5 - 6 h auf. Zellen in der stationären Phase waren unempfindlich. Der Vergleich von Generationszeit und der Zeitspanne, nach der die fungizide Wirkung festzustellen war, ergab bei Betrachtung der logarithmischen Phase jeweils einen Wert von 2.5 - 3.0 h.

3.3. Makromolekülsynthesen

3.3.1. Nukleinsäure-Synthese

Ausgehend von der Beobachtung, daß die fungizide Wirkung von Galbonolid A in zeitlicher Übereinstimmung mit dem Zellcyclus auftrat, wurde ein möglicher Einfluß auf die DNA- bzw. RNA-Biosythese durch Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen untersucht. Da sich bei Hefen eine spezifische Markierung der DNA mit Thymidin als ungünstig erwiesen hat (HARTWELL, 1967), wurde Adenin als Vorstufe eingesetzt.
Die Resultate ergaben weder eine Hemmung der RNA-Synthese (Abb. 20) noch einen Einfluß auf die DNA-Synthese (Abbildung 21).

3.3.2. Protein-Biosynthese

Der Einfluß von Galbonolid A auf die Protein-Biosythese wurde in Einbauversuchen mit markiertem Leucin als potentieller Vorstufe untersucht.
Wie in Abbildung 22 dargestellt ist, führte die Zugabe von Galbonolid A im Vergleich zur Kontrolle nach 60 min zu einer etwas geringeren Einbaurate von 83 %. Cycloheximid als Vergleichssubstanz verursachte dagegen eine totale Hemmung der Protein-Biosynthese.

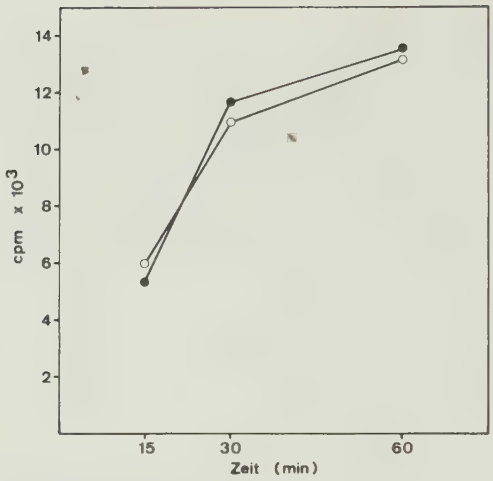


Abb. 20: Einbau von ^{14}C-Adenin (3.7 kBq/ml) (Differenz von Gesamtaktivität und alkali-resistenter fällbarer Aktivität):
—●— Kontrolle; —○— Galbonolid A (10 ug/ml)

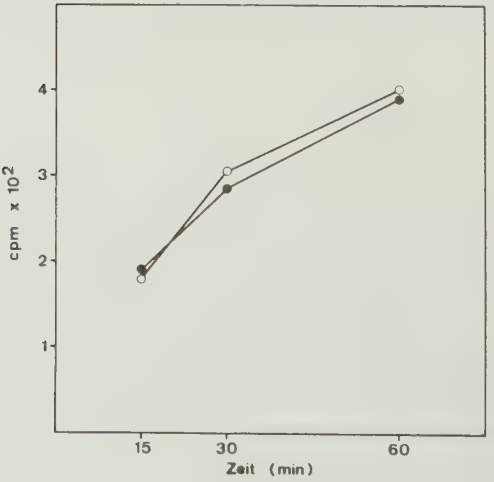


Abb. 21: Einbau von ^{14}C-Adenin (3.7 kBq/ml) (Fällung nach alkalischer Hydrolyse):
—●— Kontrolle; —○— Galbonolid A (10 ug/ml)

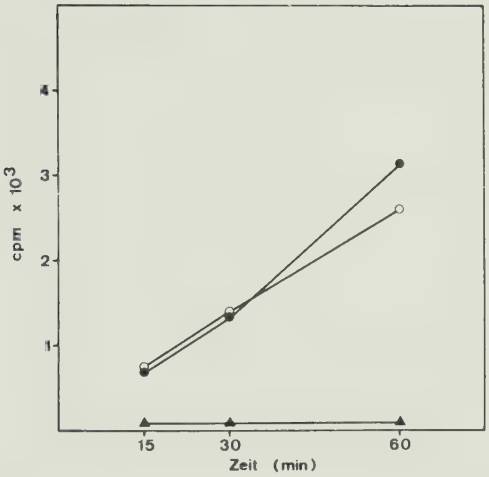


Abb. 22: Einbau von ^{14}C-D,L-Leucin (9 kBq/ml):
—●— Kontrolle; —○— Galbonolid A (10 ug/ml)
—▲— Cycloheximid (50 ug/ml)

3.3.3. Fettsäure-Biosythese

Die Biosythese der Fettsäuren, die durch Addition und Reduktion aus Acetat-Einheiten aufgebaut werden, wurde durch Einbau von markiertem Acetat untersucht.
Die Ergebnisse (Abb. 23) zeigen eine deutliche Hemmung bei Zugabe von Cerulenin, einem spezifischen Inhibitor der Fettsäure-Biosynthese (OMURA, 1976). Der Acetat-Einbau unter Galbonolid-Einfluß bewirkte hingegen mit 115 % einen leicht stimulierenden Effekt im Vergleich zur Kontrolle.

3.4. Zellwand

3.4.1. Einbauversuche

Die bei Botrytis cinerea beobachteten "Hexenbesen" (FAUTH, 1984) legten die Vermutung nahe, daß die Galbonolide derartige morphologische Veränderungen durch eine Interaktion mit der Zellwand verursachen könnten. Da die Zellwand bei

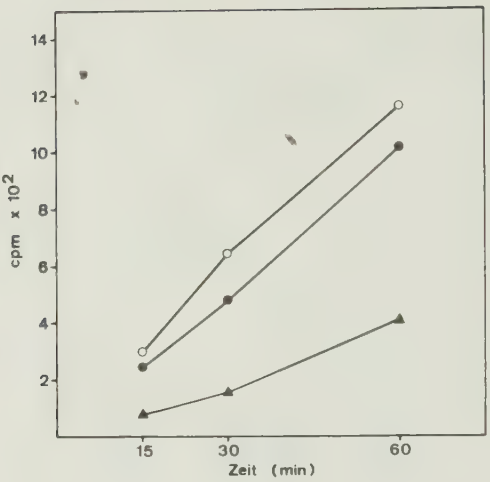


Abb. 23: Einbau von ^{14}C-Acetat (3.7 kBq/ml):
—●— Kontrolle; —○— Galbonolid A (10 ug/ml);
—▲— Cerulenin (3 ug/ml)

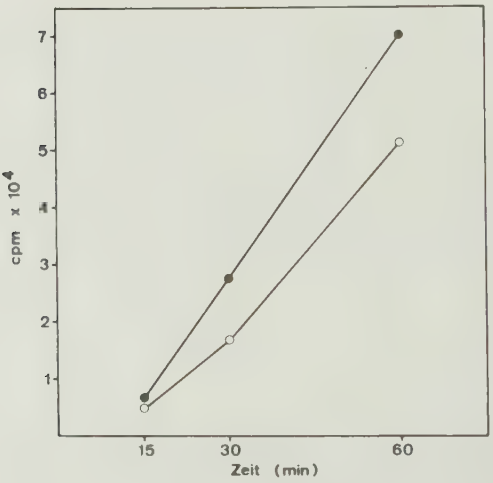


Abb. 24: Einbau von ^{14}C-D-Glucose (125 kBq/ml):
—●— Kontrolle; —○— Galbonolid A (10 ug/ml)

Hefen zu einem großen Anteil aus Glucanen besteht und Chitin nur in relativ geringer Menge vorkommt (DUFFUS et al., 1982), wurde die Zellwand-Synthese durch Einbau von markierter Glucose untersucht.
Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, verursachte Galbonolid A nach 60 min eine leichte Hemmung des Glucose-Einbaus mit 73 % gegenüber der Kontrolle.

3.4.2. Chitin-Synthase

Die von HÖHNE (1974) untersuchten Nikkomycine verursachen morphologische Veränderungen bei Pilzen, als Folge einer Hemmung der Chitinsynthase. Inwieweit Galbonolid A einen Einfluß auf dieses Enzym ausübt, wurde in vitro bei der Chitin-Synthase aus Coprinus cinereus untersucht.
Die Ergebnisse der Enzymtests (Abb. 25) zeigen, daß wie

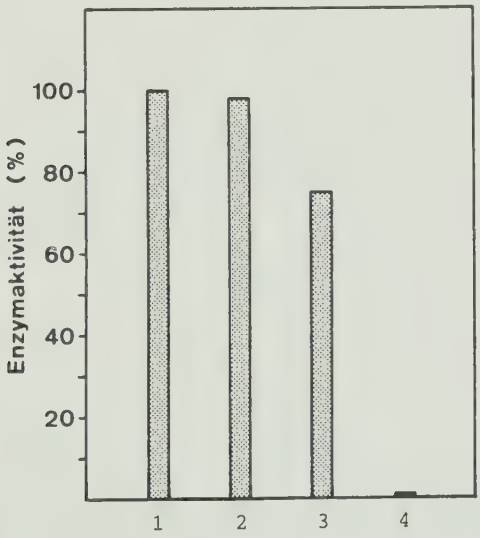


Abb. 25: Relative Aktivität der Chitinsynthase aus Coprinus cinereus:
1: Kontrolle; 2: 13 uM Galbonolid A; 3: 130 uM Galbonolid A; 4: 100 uM Nikkomycin Z

erwartet durch Nikkomycin (100 uM) eine vollständige Hemmung der Chitin-Synthase verursacht wird, bei Zusatz von 130 uM Galbonolid A betrug die Enzymaktivität 75 % und bei 13 uM Galbonolid A entsprach sie in etwa der Kontrolle.

3.5. Zellmembran

3.5.1. Liposomentest

Ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung von ionophoren Antibiotika stellt die Messung an den künstlichen Membranen von Liposomen dar (BANGHAM et al., 1965). Liposomen sind kleine Lipidvesikel, die im Idealfall aus einer Bilayerschicht bestehen und mit einer wässrigen Salzlösung (Kaliumphosphat) gefüllt sind. Da sie keine Na^+- oder K^+-Pumpen besitzen, zeigen Substanzen, die auf diese Pumpen wirken wie zum Beispiel Ouabain (CHIPPERFIELD & WHITTAM, 1973), keinen Effekt im Liposomentest.
Ionophore Antibiotika beeinflussen die Permeabilität von Membranen. Im Falle von Liposomen werden K^+-Ionen im Innern gegen H^+-Ionen im Außenmedium ausgetauscht, was zu einer Erhöhung des pH-Werts führt, der von der pH-Elektrode registriert und vom Schreiber aufgezeichnet wird.
Im Liposomentest konnte bei Zugabe von Galbonolid A in Konzentrationen von 1 mg/ml und 100 ug/ml keine Änderung des pH-Werts festgestellt werden.

3.5.2. Streifengradiententest

Eine Methode, die ionophore Wirkung von Antibiotika für zweiwertige Ionen zu untersuchen, ist durch den Streifengradiententest gegeben. Auf der Basis eines linearen Gradienten kann die Wirksamkeit des Antibiotikums auf den Testorganismus in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration geprüft werden. Zur Beurteilung der Wirkung des Antibiotikums, die unter anderem von der Zelldichte abhängig ist, war der Vergleich zweier Testanordnungen erforderlich. In der ersten Anordnung verliefen Ionengradient und der Gra-

dient der Zelldichte parallel, in der zweiten entgegengesetzt. Bei einer ionophoren Wirkung müßten Unterschiede im Hemmhofdurchmesser bei hohen Ionenkonzentrationen zu beobachten sein.
Versuche mit Galbonolid A zeigten aber lediglich die zu erwartende Abhängigkeit der Wirkung von der Zelldichte, ein Einfluß der Ionen im Medium auf die biologische Aktivität konnte nicht festgestellt werden.

3.5.3. Hämolysetest

Da die Galbonolide gegen Pilze wirksam sind und keine Aktivität gegen Bakterien zeigen, könnte die Ursache für die Wirkspezifität in den grundlegenden Unterschieden zwischen Pro- und Eukaryonten zu finden sein. Einer der in Frage kommenden Wirkorte wäre die Zellmembran. Der Unterschied zwischen prokaryontischen und eukaryontischen Membranen liegt im wesentlichen in der Art der Steroide; Prokaryonten besitzen Cholesterin in der Bilayerschicht, während bei Eukaryonten Ergosterin vorzufinden ist. Als Testmodell für die Untersuchung der Wirkung auf eukaryontische Membranen ist der Hämolysetest geeignet, da durch Störung der Permeabilität der Membran die Lyse von Erythrocyten hervorgerufen werden kann.
Im Test war infolge des natürlichen Zerfalls der Zellen ein sehr geringer Anstieg der UV-Absorption bei allen Proben zu erkennen. Bei Zusatz von Galbonolid A (10 ug/ml) bzw. Galbonolid B (10 ug/ml) konnte keine Lyse der Erythrocyten über einen Zeitraum von 24 h beobachtet werden.

3.5.4. Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere

Die Na^+K^+-ATPase, die in der Zellmembran lokalisiert ist, stellt ein aktives Transportsystem dar, das die Aufgabe hat die intracelluläre K^+-Konzentration zu erhalten. Ein Hemmstoff der Na^+K^+-ATPase ist das Herzglycosid Ouabain, dessen Wirkung darauf beruht, daß die K^+-abhängige Hydrolyse des Na^+-Komplexes blockiert wird. Eine Hemmung der

Enzymaktivität wurde ebenfalls von den Bafilomycinen beschrieben (BAUMGARTNER, 1985). Desweiteren konnten HUANG et al. (1984) zeigen, das ein neues Makrolid-Antibiotikum mit 16-gliedrigem Lactonring ein Hemmstoff der Na^+K^+-ATPase ist und ebenfalls ähnlich wie Avermectin die Freisetzung der γ-Aminobuttersäure stimuliert (PONG et al., 1980).
Versuche mit Galbonolid A zeigten keine Beeinträchtigung der Enzymaktivität gegenüber der Kontrolle, im Gegensatz zu Bafilomycin B_1 und Ouabain, unter deren Einfluß die relative Enzymaktivität mit 80 % bzw. 73 % deutlich herabgesetzt war (Abb. 26).

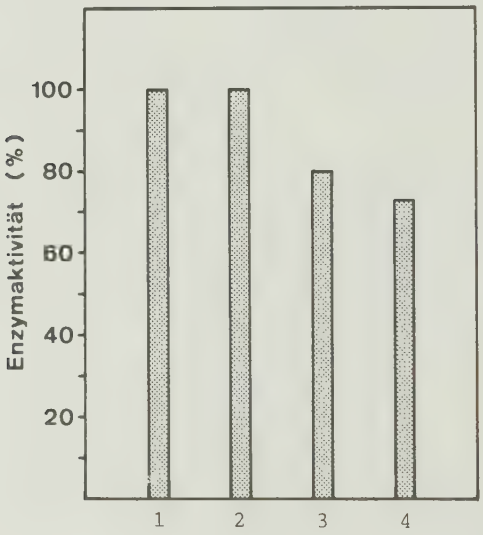


Abb. 26: Relative Aktivität der Na^+K^+-ATPase aus Hundeniere:
1: Kontrolle; 2: 25 uM Galbonolid A; 3: 10 uM Bafilomycin B_1; 4: 100 uM Ouabain

3.6. Untersuchung der Wirkung auf die Atmungskette

Mit Hilfe des Differenztests ist es möglich Substanzen als Hemmstoffe der Atmungskette zu charakterisieren. Dabei ist die Voraussetzung ein Organismus, der seine Stoffwechselenergie durch Atmung und durch Gärung gewinnen kann. Mit der echten Hefe Pichia farinosa ist ein solcher Testkeim gegeben, der mit Glucose als einziger C-Quelle sowohl durch Atmung als auch durch Gärung ATP regenerieren kann, bei Wachstum auf Acetat ist eine Energiegewinnung nur über die Atmungskette möglich. Aufgrunddessen verhindern Substanzen wie Antimycin (POTTER & REIF, 1954), das die Atmungskette zwischen Cytochrom b und c blockiert, das Zellwachstum, wenn Acetat als einzige C-Quelle vorhanden ist, während bei Wachstum auf Glucose keine Hemmwirkung zu beobachten ist.
Im Differenztest mit Pichia farinosa wurde das Zellwachstum durch Galbonolid A (10 ug/ml) und Galbonolid B (1 mg/ml) sowohl auf glucosehaltigen als auch auf acetathaltigen Testplatten gehemmt. Die Hemmhofdurchmesser bei Galbonolid A bzw. Galbonolid B betrugen jeweils 33 mm bei beiden C-Quellen.

3.7. Energiestoffwechsel

ODDS et al. (1985) zeigten, daß verschiedene antifungische Antibiotika aus der Gruppe der Imidazole den intracellulären ATP-Gehalt in ganzen Zellen und Sphaeroplasten von Candida albicans beeinflußen. Antibiotika-Konzentrationen von 10 ug/ml verursachten innerhalb von 10 min eine Verringerung des ATP-Gehalts um über 50 %, wobei eine Ausscheidung in das Außenmedium nicht zu beobachten war. Durch Messung des intracellulären ATP-Gehalts sollte geprüft werden, ob Galbonolid A einen Einfluß auf den Energiestoffwechsel ausübt.
In einer Kultur von Rhodotorula rubra wurde zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase Galbonolid A in Konzentrationen von 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1 ug/ml zugegeben. Über

einen Zeitraum von 5 h wurde jede Stunde der ATP-Gehalt bestimmt. Es ergab sich keine signifikante Absenkung des intracellulären ATP-Gehalts in Abhängigkeit von der Galbonolid-Konzentration bzw. gegenüber der Kontrolle. Der ATP-Gehalt stieg von 2.5 uM ATP/ml Kultur (bei einer optischen Dichte von 0.01 bei 578 nm) innerhalb von 5 h auf 4.0 uM ATP/ml Kultur, mit Schwankungen im Bereich von 0.5 uM ATP.

3.8. Mitose

GULL & TRINCI (1973) wiesen bei dem antifungischen Antibiotikum Griseofulvin eine Hemmung der Mitose bei Pilzen nach. Versuche mit Basidiobolus ranarum (Zygomycetes) ergaben, daß in Zellen unter Griseofulvin-Einfluß wesentlich häufiger Metaphasen auftraten und zudem Zellen mit mehreren Zellkernen zu beobachten waren. Auch Wurzelspitzen wiesen nach Griseofulvin-Behandlung eine Akkumulation von Metaphasen in den Zellen und abnormale Chromosomen-Anordnungen auf (PAGET & WALPOLE, 1958). Bei Behandlung von Wurzelspitzen mit Colchicin, das an das Tubulin der Mikrotubuli bindet und damit deren Ausbildung hemmt, zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei mit Griseofulvin behandelten Zellen.
Mit Colchicin als Vergleichssubstanz wurde der Einfluß von Galbonolid A auf die Wurzelspitzen von Bohnenkeimlingen untersucht. Wurzelspitzen, die mit Galbonolid A (50 ug/ml) behandelt wurden, zeigten ein identisches Bild beim Vergleich mit den Kontrollen mit 5 % Methanol bzw. mit reinem Wasser, während eine Behandlung mit Colchicin starke Verdickungen der Seitenwurzeln bewirkte und die erwartete Anhäufung von Zellen in der Metaphase bestätigte. Auffallend war, daß unter Galbonolid-Einfluß die Wurzeln der Bohnenkeimlinge nach 3 Tagen eine Schwarzfärbung zeigten und das Wachstum dieser Keimlinge im Vergleich zur Kontrolle deutlich verzögert war.

3.9. Samenauskeimung

Die bei Bohnenkeimlingen aufgetretene Wachstumsverzögerung gab Anlaß den Einfluß von Galbonolid A auf das Auskeimen von Kressesamen zu untersuchen.
In Konzentrationen von 100 ug/ml, 50 ug/ml und 10 ug/ml Galbonolid A konnte bei jeweils 20 untersuchten Samen keine Wachstumsverzögerung der Keimwurzel oder ein völliger Verlust der Keimfähigkeit festgestellt werden. Samen, die in Wasser gekeimt waren, hatten nach 3 Tagen eine Keimwurzellänge von 1 cm. Bei Samen mit Galbonolid-Zusatz und bei Samen der Kontrolle mit 5 % Methanol hatten die Keimwurzeln erst nach 4 Tagen eine Länge von 1 cm erreicht. Diese Wachstumsverzögerung ist somit auf das Lösungsmittel Methanol zurückzuführen und nicht auf den Einfluß von Galbonolid A.

3.10. Untersuchungen zur Antagonisierung

3.10.1. Pyridinderivate

Albocyclin, ein Antibiotikum aus der Gruppe der ungewöhnlichen Makrolide zeigt eine biologische Aktivität gegen Bakterien. NAGAHAMA et al. (1967) untersuchten die Wirkungsweise und zeigten eine Hemmung der Nicotinsäure-Biosynthese. Durch Zugabe von Nicotinsäure oder NAD konnte die Hemmwirkung aufgehoben werden.
Da Albocyclin bezüglich der chemischen Struktur (Abb. 27) eine relativ große Ähnlichkeit zu den Galbonoliden aufweist, wurde im Plattendiffusionstest untersucht, ob auch im Fall von Galbonolid A und B ein solcher Antagonismus vorliegt.
Mit Pichia farinosa als Testorganismus in Medium 15, das mit jeweils 1 ug/ml, 10 ug/ml oder 100 ug/ml NAD, Nicotinsäure bzw. Chinolinsäure supplementiert war, konnte keine Beeinträchtigung der Hemmwirkung im Vergleich zur Kontrolle ohne Supplemente beobachtet werden.

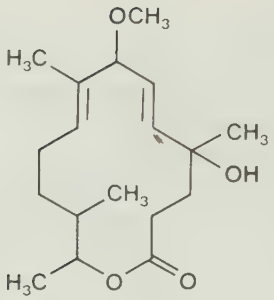


Abb. 27: Struktur von Albocyclin

3.10.2. Steroide, abgeleitete Verbindungen und weitere lipophile Substanzen

Der Einfluß von Cholesterin und Ergosterin, Vitamin D_2 und D_3, sowie den Glycerinphosphatiden Sojalecithin und Phosphatidylcholin auf die biologische Aktivität der Galbonolide wurde im Plattendiffusionstest untersucht. Ebenso wurde Ölsäure als langkettige Fettsäure und verdünnte Eigelblösung, die reich an Lecithin, Phosphatidylcholin, Cholesterin und verschiedenen Fettsäuren ist, auf einen möglichen Antagonismus getestet. Die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen, daß die Steroide die Hemmwirkung von Galbonolid A nicht beeinflussen.
Ebenso besitzen die aus Steroiden abgeleiteten D-Vitamine keine antagonistische Wirkung. Bei Glycerin-Phosphatiden und Eigelblösung hingegen war eine starke Verringerung der biologischen Aktivität zu beobachten; eine völlige Aufhebung der antifungischen Wirkung von Galbonolid A verursachte konzentrierte Ölsäure.

Tab. 5: Einfluß verschiedener lipophiler Substanzen auf die biologische Aktivität von Galbonolid A im Plattendiffusionstest mit Botrytis cinerea.

10 ul Galbonolid A (26 uM) + 10 ul Testsubstanzen	Hemmhofdurchmesser in mm
Kontrolle (kein Zusatz)	24
Lösungsmittel ($CHCl_3$/MeOH=2:1)	24
Eigelblösung (30%)	16
Eigelb unverdünnt	16
Ölsäure (10%)	13
Ölsäure unverdünnt	-
Sojalecithin-Lösung (10%)	16
Phosphatidylcholin-Lösung (10%)	10
Ergosterin (50 uM)	24
Ergosterin (5 mM)	24
Ergosterin (40 mM)	24
Cholesterin (0.38 mM)	24
Cholesterin (3.8 mM)	24
Cholesterin (38 mM)	24
Vitamin D_2 (0.1 mM)	24
Vitamin D_2 (0.5 mM)	24
Vitamin D_2 (1.0 mM)	24
Vitamin D_3 (0.1 mM)	24
Vitamin D_3 (0.5 mM)	24
Vitamin D_3 (1.0 mM)	24

IV. DISKUSSION

1. Makrolid-Antibiotika

Die Gruppe der Makrolid-Antibiotika gehört mit zu den ältesten Sekundärmetaboliten mit antimikrobieller Wirksamkeit. Der Begriff "Makrolid" geht zurück auf WOODWARD (1957), der diesen Ausdruck geprägt hat, um eine Klasse von Substanzen zu charakterisieren, die als gemeinsames Strukturmerkmal einen makrocyclischen Lactonring besitzen. Das erste Makrolid, dessen Struktur charakterisiert wurde, war das Pikromycin, das von BROCKMANN & HENKEL (1950) isoliert worden war. Ein zweites Strukturelement von Makroliden, wie Carbomycin, Erythromycin (WHILEY et al., 1957) und Leucomycin (HATA et al., 1953), ist der Zuckeranteil aus 1-3 Amino- bzw. Desoxyzuckern, der an den Lactonring gebunden ist. Mit der Beschreibung neuer Substanzen mit 3-8 konjugierten Doppelbindungen im makrocyclischen Lactonring und Makroliden ohne Zuckerreste mußte ein neues System zur Einteilung dieser Antibiotika aufgestellt werden. Nach OMURA (1984) gehören die oben genannten Antibiotika zu den "klassischen" Makroliden. Substanzen mit konjugierten Doppelbindungen im Lactonring werden als Polyene bezeichnet (HAMILTON-MILLER, 1973), und die in neuerer Zeit isolierten Verbindungen, wie z. B. die Avermectine (BURG et al., 1979) und Milbemycine (TAKIGUCHI et al., 1980), sind den ungewöhnlichen Makroliden zuzuordnen. Die Galbonolide, die weder Zuckerreste noch konjugierte Doppelbindungen im Lactonring besitzen, gehören somit zu den ungewöhnlichen Makrolid-Antibiotika. Dies ist angesichts der biologischen Wirkung dieser Substanzen eine sehr heterogene Gruppe. Die meisten Verbindungen der ungewöhnlichen Makrolide wurden aus dem antimikrobiellen Screening erhalten; es sind aber auch Verbindungen aus Screening-

Systemen für Hemmstoffe der Lymphocyten-Proliferation oder Substanzen mit Pflanzentoxizität gefunden worden. Die Vielfalt der biologischen Wirkung, die sowohl antibakterielle, antifungische und Antitumor-Aktivitäten als auch Hemmstoffe gegen Arthropoden und Nematoden, Inhibitoren der Pyruvat-Carboxylase, der oxidativen Phosphorylierung oder der Steroid-Hydroxylase umfaßt, läßt eine Einteilung nach der Art der Wirksamkeit nicht als sinnvoll erscheinen. OMURA (1984) schlägt deshalb in Analogie zu den klassischen Makroliden eine Klassifizierung nach der Größe des makrocyclischen Lactonrings vor.

Von den ungewöhnlichen Makroliden mit 14-gliedrigem Lactonring weist das antibakteriell wirksame Antibiotikum Albocyclin (NAGAHAMA et al., 1967) eine relativ große strukturelle Ähnlichkeit zu den Galbonoliden auf. Bei Betrachtung der biologischen Aktivität hingegen lassen sich keinerlei Gemeinsamkeiten feststellen. Albocyclin wirkt hauptsächlich gegen Staphylokokken, weiterhin konnte SKORUPINSKI (1985) auch eine Aktivität gegen Halobakterien nachweisen. Die Galbonolide sind dagegen ausschließlich gegen Pilze aktiv und zeigen keine Wirkung gegen Bakterien.

2. Optimierung der Galbonolid-Produktion

2.1. Stammverbesserung

Die in der Industrie praktizierte Methode der Stammentwicklung zu Hochleistungsstämmen ist die Mutagenese mit einer zufälligen und nicht selektiven Prüfung von überlebenden Mutanten. Die meisten besser produzierenden Stämme sind wahrscheinlich regulatorische Mutanten, deren Kontrollmechanismen der Antibiotika-Synthese abgeschwächt oder eliminiert worden sind (MARTIN & DEMAIN, 1980). Ein Beispiel für die Stammverbesserung ist die Optimierung in der Penicillin-Produktion von 1941-1969 (DEMAIN, 1971).

1941 lag die Syntheseleistung bei 4 mg/l; durch Verbesserungen in der Fermentation konnte die Produktion bis 1946 auf ca. 900 mg/l gesteigert werden. Anschließend verlief die Steigerung der Produktion zwar langsamer, stieg aber immer noch exponentiell bis auf fast 10 g/l im Jahre 1969 an. Dieser Erfolg ist im wesentlichen auf die Stammentwicklung durch Mutagenese zurückzuführen (DEMAIN, 1973).

Daß bei der Mutagenese von TÜ 2253 keine Mutanten mit einer höheren Galbonolid-Produktion gefunden worden sind, ist vermutlich auf die relativ geringe Anzahl der untersuchten Einzelkolonien zurückzuführen. Bei einer weitaus größeren Zahl geprüfter Kolonien (mehrere tausend) dürften auch Überproduzenten zu erwarten sein.

Die bei Streptomyceten häufig zu beobachtende Instabilität und genetische Variabilität führt oftmals zum Verlust der Antibiotika-Produktion. Dies war auch bei TÜ 2253 der Fall und zwar verstärkt, wenn der Stamm längere Zeit bei 4 °C aufbewahrt worden war und keine Flüssigpassagen bei normaler Inkubationstemperatur vorgenommen worden sind. Ausgehend von einer relativ großen Variabilität in der Galbonolid-Produktion konnten durch Klonierung 3 Stämme selektioniert werden, die deutlich besser und einheitlicher in der Produktion waren. Diese Stämme waren jedoch nicht stabil, vielmehr mußte ständig neu auf gute Produzenten selektioniert werden, um eine konstante Galbonolid-Bildung zu sichern.

2.2. Optimierung des Produktionsmediums

Die Ursachen für die negativen Resultate der Nährlösungsversuche in Minimalmedien im Bezug auf die Galbonolid-Produktion bleiben ungeklärt. Offensichtlich sind im komplexen Medium 1 Faktoren enthalten, die die Bildung der Galbonolide ermöglichen, jedoch in Minimalmedien fehlen. Versuche, diese Medien zusätzlich mit Aminosäuren, Spurenele-

menten oder hitzelabilen B-Vitaminen zu supplementieren, blieben ebenfalls erfolglos. Demzufolge war es auch nicht möglich, ein resting-cell-System aufzustellen, um darin den Einfluß verschiedener Substanzen zu analysieren.

Die Biosynthese der Makrolide geht von Acetat- und Propionat-Einheiten aus, die zu Malonyl-CoA bzw. Methylmalonyl-CoA carboxyliert werden und durch Kopf-Schwanz-Addition kettenartig aneinander geknüpft werden. Die daraus entstehenden β-Polyketosäuren führten zu dem Begriff Polyketide als Ausdruck für den gemeinsamen Biosyntheseweg aller Makrolide. Die Synthese erfolgt an einem Multienzymkomplex ähnlich der Fettsäure-Biosynthese, deren Vorstufen ebenfalls Acetat- und Propionat-Einheiten darstellen. Somit ist die Fettsäure- und Makrolid-Biosynthese ein Beispiel für einen verzweigten Stoffwechselweg, dessen Endprodukte einerseits Primärmetaboliten und andererseits Sekundärmetaboliten bilden. Aufgrund der Kenntnis des Biosynthesewegs ergibt sich nun die Möglichkeit, durch gezielte Methoden die Produktion von sekundären Stoffwechselprodukten in positiver Weise zu beeinflussen. Allerdings ist über Induktoren und Effektoren oder die Regulation des sekundären Stoffwechselzweigs noch wenig bekannt.

Ein Ansatzpunkt für die Produktionssteigerung der Galbonolide war die Verfütterung potentieller Vorstufen, wie Acetat und Propionat oder auch von Substanzen, die zu diesen Vorstufen umgewandelt werden können. Auf der Basis von Nährmedium 1 konnte durch Zugabe von 1 mM Isoleucin die Galbonolid-Bildung erhöht werden, während Valin keinen Einfluß zeigte. Im Stoffwechsel werden beide Aminosäuren zu aktivierten Fettsäuren abgebaut. Aus Valin entstehen Acetyl-CoA und Acetacetat, der Abbau von Isoleucin liefert jeweils ein Molekül Acetyl-CoA und Propionyl-CoA. Da die Abbauprodukte beider Aminosäuren Ausgangssubstanzen für die Makrolid-Biosynthese liefern, aber nur Isoleucin einen stimulatorischen Effekt aufweist, ist es nicht sehr wahrscheinlich, daß Isoleucin als potentielle Vorstufe fun-

giert. Möglicherweise spielt Isoleucin, durch Erhöhung des Pools an benötigten Vorstufen als Voraussetzung für eine erhöhte Sekundärmetaboliten-Produktion, eine Rolle als Induktor oder Effektor (RACZYNSKA-BOJANOWSKA et al., 1973). GRÄFE et al. (1975) stellten die Theorie auf, daß erst durch ein Überangebot entsprechender Vorstufen die Biosynthesekette des Sekundärstoffwechsels induziert würde und dies infolge einer erhöhten Aktivität der Enzyme, die zu diesen Vorstufen führen, wie die Pyruvat-Decarboxylase und die Acetyl- bzw. Propionyl-Carboxylase. Die bei TÜ 2253 beobachtete Stimulation der Galbonolid-Synthese durch Acetat, Pyruvat, Phenylbrenztraubensäure und Methylmalonsäure können in diesem Sinne als Faktoren, die den intracellulären Pool an Vorstufen erhöhen, interpretiert werden. CORCORAN (1974) hat gezeigt, daß Methylmalonsäure eine effektive Vorstufe des Aglycons von Erythromycin A darstellt. Die Vorstufe, die zum überwiegenden Teil für die Bildung des Aglycons Erythronolid A verwendet wird, ist jedoch Propionat. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen führte die Supplementation von Propionat bei TÜ 2253 nicht zu einer Steigerung der Galbonolid-Bildung, obwohl Propionat theoretisch eine Vorstufe darstellen sollte. Möglicherweise fließt Propionat eher in die Stoffwechselwege des Primärmetabolismus, da die Galbonolid-Produktion während der Trophophase erfolgt und somit der Sekundärmetabolismus, im Hinblick auf die Verfügbarkeit der Vorstufen, in Konkurrenz zum Primärmetabolismus zu sehen ist. Die stimulierende Wirkung von Phosphatidylcholin und Sojalecithin könnte auf die Fettsäurereste, die an die Phosphatidsäure gebunden sind, zurückzuführen sein, - und dies in der Funktion als Lieferant von Acetyl-Resten, die beim Abbau entstehen. Bei Supplementation von produktionsstimulierenden Komponenten in Kombination war nur bei gleichzeitiger Verfütterung von 1 mM Isoleucin, 3 mM Methylmalonsäure und 1 % Phosphatidylcholin eine weitere Produktionssteigerung zu erzielen. Die Verbesserung der Produktion auf 4.5 mg/l entspricht einer Steigerung von 257 % gegenüber Medium 1 mit 1.75 mg/l.

Die Frage, warum alle anderen Kombinationen keinen additiven Einfluß auf die Produktion ergeben haben, bleibt offen. Möglicherweise wird der verzweigte Stoffwechselweg von Makroliden noch relativ stark reguliert, so daß ein Überangebot von Vorstufen nur bedingt einen positiven Effekt bewirken kann.

2.3. Fermentation

Die Bildung der Galbonolide von TÜ 2253 ist dadurch gekennzeichnet, daß sie nicht wie bei vielen Antibiotika-Produzenten im Anschluß an die Wachstumsphase erfolgt, sondern parallel mit der wachsenden Kultur verläuft. Durch die Kopplung der Sekundärmetabolit-Synthese an das Wachstum des Stammes waren Faktoren wie Sauerstoffversorgung und Massentransfer entscheidend für die Galbonolid-Produktion. Der kritische Wert für eine nicht-limitierende Sauerstoffversorgung lag bei etwa 40-50 % Sauerstoffpartialdruck. Mit Erhöhung der Rührerdrehzahl von 200 auf 300 Upm konnte erstens ein Absinken des pO_2 unter diesen kritischen Wert vermieden werden, zweitens hatte die erhöhte Rührgeschwindigkeit ein Wachstum des Stammes in kleinen Pellets zur Folge. Diese Veränderung in der Morphologie begünstigte zusätzlich die Produktion infolge einer besseren Substrat- und Sauerstoffversorgung. Als Resultat ergab sich eine Produktionssteigerung von 0.8 mg/l auf 5 mg/l. In Fermentationen im 20 l-Maßstab, die als Vorkultur im Hinblick auf eine größere Produktbildung im 200 l Fermenter durchgeführt wurden, war eine deutlich geringere Galbonolid-Synthese zu beobachten als bei 10 l Fermentationen. Die Ursachen hierfür sind vermutlich in der Konstruktion der Reaktoren zu suchen. Denn bei den verwendeten 20 l Fermentern kommt es infolge des Umwurfsystems zu einer verstärkten Scherkraftwirkung, die offenbar zu einer größeren mechanischen Belastung der Zellen und damit zu einer geringeren Produktion führt. In ähnlicher Weise hatten Fermentationen mit hohen Drehzahlen in Blattrührfer-

mentern, in denen ebenfalls eine hohe Scherkraftwirkung auftritt, eine niedrige Galbonolid-Produktion zur Folge gehabt.

Die Annahme, daß der Anstieg des pH-Werts mit der Zunahme der biologischen Aktivität bei TÜ 2253 negativ korreliert, hat sich nicht bestätigt. In pH-statischen Fermentationen konnte keine weitere Steigerung der Galbonolid-Bildung erzielt werden. Dennoch ist der Einfluß des pH-Werts nicht unbedeutend, da bei geregelten Fermentationen mit einem pH-Wert von 6.0 der rasche Abbau des Antibiotikums vermieden werden konnte.

Auch durch feeding-Fermentation mit Glucose wurde keine Erhöhung der Produktionsrate erreicht. Vergleichbar mit der pH-statischen Fermentation wurde die Abnahme der biologischen Aktivität nach Erreichen des Maximums verzögert.

Einen Einfluß auf die Fermentation, dem vergleichbare Bedeutung zukommt wie im Fall von Glucose bezüglich einer Katabolit-Regulation, besitzt die Konzentration von Phosphat im Nährmedium (MASUMA et al., 1986). Phosphat-Konzentrationen, bei denen das Wachstum optimal ist, wirken in vielen Fällen inhibitorisch auf die Antibiotika-Synthese. Die Phosphat-Konzentrationen, die gerade noch toleriert werden, um eine Antibiotika-Synthese zu ermöglichen, sind sehr unterschiedlich. Sie bewegen sich in Größenordnungen von 0.1 - 50 mM, wohingegen Wachstum bis 500 mM möglich ist. Der Kontrollmechanismus der Antibiotika-Synthese durch Phosphat wird in einer intracellulären Vermittlung über ATP als Effektor vermutet. Durch Phosphat wird die Aktivität des Tricarbonsäurecyclus erhöht, ebenso die Respirationsrate und die Makromolekül-Synthese (LIU et al., 1975; MARTIN, 1977; MARTIN et al., 1978). Untersuchungen des intracellulären ATP-Gehalts von JANGLOVA et al. (1969) bei guten und weniger guten Chlortetracyclin-Produzenten bestätigen diese Annahme, wobei eine negative Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Antibiotika-Produktion zu ver-

zeichnen ist. Wie Phosphat-Bestimmungen bei Fermentationen mit TÜ 2253 ergaben, dürfte aufgrund der sehr geringen Phosphat-Konzentration (< 0.2 mM) der Phosphat-Gehalt im Produktionsmedium kein repressiver Faktor für die Galbonolid-Bildung sein.

Neben Glucose und Phosphat besteht auch eine Abhängigkeit der Sekundärmetaboliten-Produktion von der Stickstoff-Konzentration in der Nährlösung. Anorganische Stickstoff-Zusätze wirken sich meist ungünstig auf die Antibiotika-Synthese aus. Durch Verwendung von langsam metabolisierbaren Stickstoff-Quellen kann einer Stickstoff-Katabolit-Repression begegnet werden. Mit Hefeextrakt als komplexer und langsam resorbierter Stickstoff-Quelle war bei der Fermentation von TÜ 2253 eine günstige Voraussetzung für eine niedrige NH_4-Konzentration im Medium gegeben, was durch Ammonium-Bestimmung bestätigt werden konnte. Die erst gegen Ende der Fermentation aufgetretene Erhöhung der Ammonium-Ionen ist auf die Lyse der Zellen zurückzuführen. Da während der Produktionsphase die Ammonium-Konzentration sehr gering war, ist eine Stickstoff-Katabolit-Repression bei der Galbonolid-Synthese auszuschließen.

Ein für die Produktionsoptimierung entscheidender Faktor stellte die Temperatur dar. Mit einem Temperatur-Shift von 27 °C auf 19.5 °C verlängerte sich zwar die Fermentationsdauer, gleichzeitig verbesserte sich aber auch die Galbonolid-Bildung. Mit Supplementation von 1 mM Isoleucin, 3 mM Methylmalonsäure und 1 % Phosphatidylcholin und herabgesetzter Temperatur im Produktionsfermenter konnte die Produktion von 5 mg/l auf 20 mg/l gesteigert werden. Eine Erklärung für diesen Temperatureffekt könnte darin liegen, daß die bei der Galbonolid-Synthese beteiligten Enzyme ein niedrigeres Temperaturoptimum besitzen, wodurch die Effektivität der Produktion vergrößert würde. Als weitere Ursache können auch die Enzyme in Frage kommen, die für den Abbau der Galbonolide verantwortlich sind und bei Temperaturen von 19.5 °C die Abbaureaktion langsamer katalysieren

könnten. Bei einer dritten Möglichkeit könnte durch verlangsamtes Wachstum des Stammes infolge niedrigerer Temperatur und den dadurch bedingten geringeren Stoffdurchsatz im Primärstoffwechsel mehr Vorstufen für den Sekundärstoffwechsel zur Verfügung stehen, wodurch schließlich eine höhere Galbonolid-Bildung resultieren könnte. Desweiteren dürfte sich die Absenkung der Temperatur sicherlich auch günstig auf die Stabilität der Verbindungen auswirken. Bei Temperaturen von 19 - 20°C, die für das Wachstum nicht optimal sind, ist zu vermuten, daß der Verbrauch von Vorstufen für die Fettsäure-Biosynthese herabgesetzt ist. Demzufolge könnten diese Vorstufen in den Sekundärmetabolismus fließen, und dann könnten möglicherweise Supplemente, die als potentielle Vorstufen für die Galbonolid-Synthese fungieren, einen weitaus größeren Effekt bewirken als dies bei Inkubationstemperaturen von 27 °C der Fall war. Parallel dazu könnte sich auch eine feeding-Fermentation bei 19.5 °C stimulierend auf die Galbonolid-Produktion auswirken. Untersuchungen hierzu müßten noch durchgeführt werden.
Aufgrund der relativ hohen Verluste bei der Aufarbeitung (ACHENBACH et al., 1987), müssen auch bei der Reinigung und Isolierung der Galbonolide Versuche unternommen werden, die Ausbeute zu verbessern, sodaß mit den Erfolgen der Produktionsoptimierung auch eine größere Menge an Reinsubstanz erhalten werden kann, die für weitere Prüfungen benötigt wird.

3. Untersuchungen zur Wirkungsweise

Aus Kulturen des Streptomyceten-Stammes TÜ 2253 konnten mit Galbonolid A und B zwei neue Verbindungen isoliert werden, die der Gruppe der ungewöhnlichen Makrolide zuzuordnen sind. Beide Substanzen sind dadurch charakterisiert, daß ihr Wirkspektrum ausschließlich auf Pilze begrenzt ist. Dies legt die Vermutung nahe, daß der Wirkort der Galbonolide in den essentiellen Unterschieden zwischen

Bakterien und Pilzen zu suchen ist. Die Untersuchungen bezüglich der Sensitivität verschiedener Pilze geben jedoch keine Hinweise auf die Richtigkeit dieser Annahme, da einige Species unempfindlich gegenüber den Galbonoliden waren. Diese Tatsache kann aber auch aufgrund von Transport- oder Diffusionsvorgängen zu erklären sein, da innerhalb des taxonomischen Systems der Pilze relativ große Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellwand vorhanden sind (BARTNICKI-GARCIA, 1968). Somit könnte dadurch, daß die Antibiotika nicht zum Wirkort gelangen können - vorausgesetzt er liegt in der Zelle - eine Resistenz auftreten. Die Erklärung für die unterschiedliche Wirkung bei Pilzen kann aber auch gleichermaßen für die Unempfindlichkeit von Bakterien geltend gemacht werden, zumal Prokaryonten auch einen völlig anderen Aufbau der Zellwand besitzen.

Die negativen Resultate der Untersuchungen der Makromolekül-Synthesen zeigen, daß offensichtlich die DNA-, RNA-, Fettsäure- und Proteinbiosynthese nicht als Wirkort in Frage kommen. Die leichte Hemmung der Proteinbiosynthese ist sicherlich als Sekundäreffekt zu werten, denn die bei Einbauversuchen verwendeten Antibiotika-Konzentrationen lagen weit über der minimalen Hemmkonzentration, die im Plattendiffusionstest und im Reihenverdünnungstest ermittelt worden war. Die fungizide Wirkung der Galbonolide kann sicher nicht mit einer 83 %igen Restaktivität bei der Proteinbiosynthese erklärt werden.
In gleicher Weise wäre die inhibitorische Wirkung von Galbonolid A auf die Chitinsynthase (75 % Enzymaktivität) zu betrachten, die somit ebenfalls nicht als primärer Wirkort in Frage kommt.

Ausgehend von der Galbonolid-Wirkung in Abhängigkeit von der Wachstumsphase bei Rhodotorula rubra, wo eine starke Korrelation zwischen Generationszeit und fungizider Wirkung zu beobachten war, und dem Ergebnis der Untersuchung der Proteinbiosynthese könnte es denkbar sein, daß durch einen Eingriff auf der Ebene der Translation die anti-

fungische Wirkung zustande kommt. Die Möglichkeit, daß Enzyme nicht in ausreichender Menge oder "falsche" Enzyme synthetisiert werden, würde unter Umständen in der Zelle dazu führen, daß lebensnotwendige Prozesse nicht mehr ablaufen können. Der bisher vorhandene Pool an Enzymen würde noch eine gewisse Zeit ausreichend sein, um die Zelle am Leben zu erhalten, doch spätestens in der nächsten Generation müßten dann letale Folgen auftreten. Versuche, die diese Theorie stützen könnten, möglicherweise durch Analyse von Stoffwechselvorgängen, stehen noch aus.

Untersuchungen zur Antagonisierung haben gezeigt, daß die Hemmwirkung der Galbonolide mit Ölsäure, Eigelblösung, Phosphatidylcholin und Sojalecithin teilweise oder vollständig aufzuheben ist. Es muß offensichtlich eine Interaktion, eine Bindung oder eine Komplexbildung zwischen diesen Lipiden und den Galbonoliden angenommen werden. YAMAGUCHI (1977) hat bei zwei Imidazol-Antibiotika gezeigt, daß sie durch Membranlipide von Candida albicans und verschiedene andere Lipide antagonisiert werden. Die antifungische Aktivität von Clotrimazol und Miconazol konnte unter anderem durch Ölsäure, Vitamin D und ungesättigte Phospholipide signifikant verringert werden. Bei einer anderen Substanzgruppe, den Polyenen, ist der Antagonismus zu Steroiden die Ursache für Permeabilitätsänderungen der Zellmembran, die schließlich zur Porenbildung führen (GOTTLIEB et al., 1958; KINSKY, 1961; NORMAN et al., 1976).
Ein vergleichbarer Effekt kann nun auch für die Galbonolide diskutiert werden. Bei Betrachtung der Zellmembran von Pilzen, die unter anderem Phospholipide und Steroide enthält (LONGLEY et al., 1968), könnte der Einfluß der Galbonolide eine Veränderung des flüssig-kristallinen Zustands der Membran zur Folge haben (SINGER & NICOLSON, 1972), was wiederum die Funktion oder auch Enzyme, die an der Membran assoziiert sind, ebenso wie Pigmentsysteme (Cytochrome) beeinflussen würde. Die Chitinsynthase, die an der Cytoplasmamembran gebunden ist (DURAN & CABIB, 1979), wäre

möglicherweise dann betroffen. Mit dieser Überlegung konnte die leichte Hemmung der Chitinsynthase durch die Galbonolide erklärt werden. Die bei Botrytis beobachteten morphologischen Veränderungen (FAUTH, 1984) - vielleicht als Folge einer Störung der Membraneigenschaft oder Membranfunktion - würden ebenfalls im Einklang mit dieser Theorie stehen.
Veränderungen der Membranpermeabilitat durch Porenbildung oder fehlende Selektivität für Ionen wie bei den Polyenen sind im Falle der Galbonolide auszuschließen, wie Versuche mit Liposomen und Streifengradiententests gezeigt haben. Abzugrenzen wäre die Wirkungsweise der Antibiotika aus TÜ 2253 aber auch von den Imidazolen, die auch die Ergosterin-Biosynthese hemmen (van den BOSSCHE et al., 1980), da die Galbonolide nicht durch Ergosterin und Cholesterin antagonisiert werden konnten. Dennoch sind Parallelen zu Imidazol-Antibiotika und Polyenen zu erkennen, wobei die Zellmembran eine wichtige Rolle hinsichtlich der Wirkungsweise einnimmt. So haben BEGGS et al. (1981) bei Imidazolhaltigen Verbindungen eine zeitliche Verzögerung bis zum Auftreten der fungiziden Wirkung festgestellt, vergleichbar mit den Galbonoliden, wobei bei den Imidazol-Antibiotika als direkter Wirkmechanismus die Disorganisation der Membran verantwortlich ist. Morphologische Veränderungen sind bei dem 16-gliedrigen Makrolid Rhizoxin (TAKAHASHI et al., 1987), das wie die Galbonolide nur gegen Pilze, nicht aber gegen Bakterien wirksam ist, auf eine Hemmung der Tubulin-Polymerisation zurückzuführen, - vergleichbar mit der Wirkung anderer Spindelgifte wie beispielsweise Colchizin. Da Versuche mit Bohnenkeimlingen keine Beeinflussung des Mitoseablaufs unter Einwirkung von Galbonolid A gezeigt haben, ist eine derartige Wirkungsweise nicht sehr wahrscheinlich. Ein weiteres antifungisches Antibiotikum, das morphologische Veränderungen verursacht, beschrieben HAMAMOTO et al. (1983). Die Autoren vermuten, daß Leptomycin A und B den Zellzyklus durch Blockierung der Kern- und Zellteilung in der G2-Phase der Mitose beeinflussen, was durch verminderte Einbauraten in

Untersuchungen der DNA- und RNA-Biosynthese zum Ausdruck kommt (HAMAMOTO et al., 1985). Mit Galbonolid A konnte eine Hemmung der Nukleinsäure-Biosynthese nicht beobachtet werden, wodurch ein mit den Leptomycinen vergleichbarer Wirkungsmechanismus auszuschließen wäre.

Innerhalb der Gruppe der Makrolide wie auch bei Antibiotika aus anderen chemischen Gruppen lassen sich Parallelen zur Wirkungsweise der Galbonolide aufzeigen, obgleich wenig oder keine Gemeinsamkeiten in der chemischen Struktur zu erkennen sind, wie die Beispiele Rhizoxin, Leptomycin A und B, Imidazol-Antibiotika und Polyene belegen. Eine vergleichbare Konvergenz ist auch im Bezug auf die strukturelle Zugehörigkeit der Sekundärmetabolite zu beobachten; so ist die Produktion makrocyclischer Antibiotika nicht nur auf die Gattung Streptomyces beschränkt. Als Beispiel wären die Makrolide Rustmicin und Neorustmicin A zu nennen, die aus einem Micromonospora-Stamm isoliert worden sind (TAKATSU et al., 1985; ABE et al., 1985). Weiterhin konnten mit den Patuloliden (RODPHAYA et al., 1986) Makrolid-Antibiotika aus einem Pilz, Penicillium urticae, isoliert werden. Schon anhand dieser wenigen Beispiele wird deutlich, daß von einer Korrelation zwischen Wirkungsmechanismus und Struktur bzw. systematischer Stellung der Produzenten nicht ausgegangen werden kann. Hingegen können umgekehrt Parallelen in der Wirkungsweise Ansatzpunkte zur Klärung des Wirkorts liefern.

Mit den durchgeführten Versuchen konnten keine beweiskräftigen Aussagen über den spezifischen Wirkort der Galbonolide gemacht werden, dennoch ergaben sich Hinweise, die zu zwei Modellvorstellungen geführt haben. In der ersten Theorie ist die Wirkung der Galbonolide auf eine Beeinflussung auf der Ebene der Translation zurückzuführen, in der zweiten steht die Interaktion der Galbonolide mit Membranbestandteilen im Vordergrund. Weitere Untersuchungen sind notwendig für eine detaillierte Aufklärung des Wirkorts.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die aus Streptomyces galbus ssp.eurythermus TÜ 2253 isolierten Sekundärmetabolite Galbonolid A und B werden in der Trophophase produziert. Die Galbonolide sind den ungewöhnlichen Makroliden zuzuordnen; sie besitzen einen 14-gliedrigen Lacton-Ring, der nicht glycosiliert ist und keine konjugierten Doppelbindungen enthält.
Die Galbonolide A und B sind identisch mit Rustmicin bzw. Neorustmicin A.

Die Reinigung und Isolierung erfolgte durch Extraktionen von Kulturfiltrat und Mycel und anschließender Säulenchromatographie an Sephadex LH 20 und TSK HW40.

Die Galbonolide sind temperaturempfindlich und instabil bei sauren und alkalischen pH-Werten.

Der Nachweis der Antibiotika aus TÜ 2253 war nur über die biologische Methode des Plattendiffusionstests mit Botrytis cinerea möglich.

Mit den angewandten Selektionsmethoden gelang es nicht Überproduzenten zu erhalten, jedoch konnten durch Klonierung besser produzierende Mutanten selektioniert werden.

In Schüttelkolbenversuchen mit gepufferten Medien war die Galbonolid-Bildung bei einem pH-Wert von 6.0 am besten. Eine produktionsstimulierende Wirkung wurde durch die Zugabe von 1 mM Isoleucin, 5 mM Acetat, 1 mM Pyruvat, 1 mM Succinat, 3 mM Methylmalonsäure, 1 mM Phenylbrenztraubensäure, 3 % Sojalecithin und 1 % Phosphatidylcholin erzielt. In der Fermentation lag die maximale Produktion zu

Beginn der Optimierung bei 0.8 mg/l. Die Galbonolid-Bildung konnte nach Optimierung physikalischer Parameter auf 5 mg/l erhöht werden. Mit Supplementation von 1 mM Isoleucin, 3 mM Methylmalonsäure und 1 % Phosphatidylcholin, sowie einem Temperatur-Shift von 27 auf 19.5 °C wurde eine weitere Produktionssteigerung auf 20 mg/l erzielt.

Die Bildung der Galbonolide unterliegt einer Katabolitrepression durch Glucose. Mit einem Glucose-feeding konnte die Produktion jedoch nicht gesteigert, sondern nur einem raschen Abbau entgegengewirkt werden. Fermentationen mit pH-Regelung zeigten dieselben Resultate.

Die biologische Aktivität der Galbonolide erstreckte sich ausschließlich auf Pilze, wobei die Wirkung ein sehr breites Spektrum umfaßte. Hefen und Fungi imperfecti waren mit MHK-Werten zwischen 50 und 100 ng/ml sehr sensitiv. Bei Botrytis cinerea konnten morphologische Veränderungen des Hyphenwachstums beobachtet werden.
Der primäre Wirkort der Galbonolide bleibt ungeklärt; doch konnten Hinweise erhalten werden, die einerseits eine Wirkungsweise auf der Ebene der Translation vermuten lassen, oder andererseits den primären Wirkort in der Zellmembran lokalisieren.

ABE, Y.; NAKAYAMA, H.; SHIMAZU, A.; FURIHATA, K.; IKEDA, K.; FURIHATA, K.; SETO, H. & N. OTAKE: Neorustmicin A, a new macrolide active against wheat stem rust fungus. J. Antibiot. **38**, 1810-1812 (1985)

ACHENBACH, H.; MÜHLENFELD, A.; FAUTH, U. & H. ZÄHNER: Galbonolides A and B - Two new non-glycosidic antifungal macrolides from Streptomyces galbus. Tetrahedron Lett. **26**, 6167-6170 (1985)

ACHENBACH, H.; MÜHLENFELD, A.; FAUTH, U. & H. ZÄHNER: The galbonolides, novel powerful antifungal macrolides from Streptomyces galbus ssp. eurythermus. Ann. N.Y. Acad. Sci. (1987) (in press)

AHARONOWITZ, Y. & A. L. DEMAIN: Influence of inorganic phosphate and organic buffers on cephalosporin production by Streptomyces clavuligerus. Arch. Microbiol. **115**, 169-173 (1977)

AUDEN, J.; GRUNER, J.; NÜESCH, J. & F. KNÜSEL: Some statistical methods in nutrient medium optimalisation. Path. Microbiol. **30**, 858-866 (1967)

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M. & J. C. WATKINS: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol. **13**, 238-252 (1965)

BARTNICKI-GARCIA, S.: Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Ann. Rev. Microbiol. **22**, 87-108 (1968)

BAUMGARTNER, A.: Bafilomycine - Sekundärmetabolite aus Streptomyces griseus mit fungizider und insektizider Wirkung. Dissertation Universität Tübingen (1985)

BEGGS, W.; ANDREWS, F. & G. SAROSI: Action of imidazole-containing antifungal drugs. Life Sciences **28**, 111-118 (1981)

BICKEL, H.; GÄUMANN, E.; KELLER-SCHIERLEIN, W.; PRELOG, V.; VISCHER, E.; WETTSTEIN, A. & H. ZÄHNER: Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine und ihre Antagonisten, die eisenhaltigen Antibiotika Sideromycine. Experientia **16**, 129-133 (1960)

BIRCH, A. J.: Biosynthesis of polyketides and related compounds. Science **156**, 202-206 (1967)

van den BOSSCHE, H.; WILLEMSENS, G.; CORNELISSEN, F.; LAUWERS, W. F. & J. M. CUTSEM: In vitro and in vivo effects of the antimycotic drug ketoconazole on sterol biosynthesis. Antimicrob. Agents Chemother. **17**, 922-928 (1980)

BRENNER, S.: The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics **77**, 71-94 (1974)

BROCKMANN, H. & W. HENKEL: Pikromycin, ein neues Antibiotikum aus Actinomyceten. Naturwissenschaften **37**, 138-139 (1950)

BU'LOCK, J. D.: The biosynthesis of natural products. Introduction to secondary metabolism. McGraw-Hill. London-New York-Toronto-Sydney (1965)

BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMANN, R.; KONG, Y.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLICK, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R. & S. OMURA: Avermectins, a new family of potent antihelmintic agents. Producing organism and fermentation. Antimicrob. Agents Chemother. **15**, 361-367 (1979)

CHEN, P.S.; TORIBA, T.Y. & H. WARNER: Microdetermination of phosphorus. Analyt. Chem. **28**, 756-1758 (1956)

CHIPPERFIELD, A. R. & R. WHITTAM: Ouabain binding to the sodium pump. Nature **242**, 62-63 (1973)

CORCORAN, J. W.: Lipid and macrolide biosynthesis in Streptomyces erythreus. Dev. Ind. Microbiol. **15**, 93-100 (1974)

DEMAIN, A. L.: Overproduction of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation. Adv. Biochem. Eng. **1**, 113-142 (1971)

DEMAIN, A. L.: Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites. J. Appl. Chem. Biotechnol. **22**; 345-362 (1972)

DEMAIN, A. L.: Mutation and the production of secondary metabolites. Adv. Appl. Microbiol. **16**, 177-202 (1973)

DEMAIN, A. L. & E. INAMINE: Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (α-D-mannosidase) formation. Bacteriol. Rev. **34**, 1-19 (1970)

DEMAIN, A. L. & J. M. PIRET: Why secondary metabolism? In: Microbiology. Schlessinger, D. (ed.), 363-366. American Society for Microbiology. Washington, D.C. (1981)

DOCUMENTA GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen. 7. Auflage (1968)

DRAUTZ, H.: Lysolipin I. Ein neues Antibiotikum aus Streptomyces violaceoniger. Dissertation Universität Tübingen (1975)

DREW, S. W. & A. L. DEMAIN: Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 31; 343-356 (1977)

DUFFUS, J. H.; LEVI, C. & D. J. MANNERS: Yeast cell wall glucans. Adv. Microb. Physiol. **23**, 151-181 (1982)

DURAN, A. & E. CABIB: Chitin-Synthetase distribution on yeast plasma membrane. Science **203**, 363-365 (1979)

ENSIGN, J. C.: Properties and germination of Streptomyces spores and a suggestion for function of antibiotics. In: Microbiology, Schlessinger, D. (ed.), 531-533, American Society for Microbiology. Washington, D.C. (1976)

ENSIGN, J. C.: Formation, properties and germination of actinomycete spores. Ann. Rev. Microbiol. **32**, 185-219 (1978)

FAUTH, U.: Isolierung eines antifungischen Antibiotikums aus Streptomyces galbus. Diplomarbeit Universität Tübingen (1984)

FAWCETT, J. K. & J. E. SCOTT: J. Clin. Pathol. **13**, 156 (1960)

FRIEDMAN, S. M.; KANEDA, T. & J. W. CORCORAN: Antibiotic glucosides. V. A comparison of 2-methylmalonate and propionate as precursors of the C_{21} branched chain lactone in erythromycin. J. Biol. Chem. **239**, 2386-2391 (1964)

GOODAY, G. W. & A. de ROUSSET-HALL: Properties of chitin synthase from Coprinus cinereus. J. Gen. Microbiol. **89**, 137-145 (1975)

GOTTLIEB, D.; CARTER, H. E.; SLONECKER, J. H.& A. AMMANN: Protection of fungi against polyen antibiotics by sterols. Science, **128**, 361 (1958)

GRÄFE, U.: Möglichkeiten zur gezielten Manipulation der Genexpression des mikrobiellen Sekundärstoffwechsels. Z. Allg. Mikrobiol. **21**, 373-409 (1981)

GRÄFE, U.; BOCKER, H. & THRUN, H.: Precursorbildung und Biosynthese des Macrolidantibioticums A 6599 (Turimycin) durch Streptomyces hygroscopicus JA 6599. Allg.Mikrobiol. **15**, 249-257 (1975)

GULL, K. & A. P. J. TRINCI: Griseofulvin inhibits fungal mitosis. Nature **244**, 292-294 (1973)

GUNJI, S., ARIMA, K. & T. BEPPU: Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. Agric. Biol. Chem. **47**, 2061-2069 (1983)

HAMAMOTO, T.; GUNJI, S.; TSUJI, H. & T. BEPPU: Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of producing strain and their fermentation, purification and characterisation. J. Antiobiot. **36**, 639-645 (1983)

HAMAMOTO, T.; UOZUMI, T. & T. BEPPU: Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. III. Mode of action of Leptomycin B on Schizosaccharomyces pombe. J. Antibiot. **38**, 1573-1580 (1985)

HAMILTON-MILLER, J. M. T.: Chemistry and biology of the polyen macrolide antibiotics. Bacteriol. Rev. **37**, 166- 196 (1973)

HARTWELL, L. H.: Macromolecule synthesis in temperature-sensitive mutants of yeast. J. Bacteriol. **93**, 1662-1670 (1967)

HASENBÖHLER, A.: Instrumentierung von Fermentationsanlagen. Dissertation Universität Tübingen (1978)

HATA, T.; SANO, Y.; OHKI, M.; YOKOHAMA, Y.; MATSUMAE, A. & S. ITO: Leucomycin, a new antibiotic. J. Antibiot. **6**, 87-89 (1953)

HÖHNE, H.: Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese. Dissertation Universität Tübingen (1974)

HOPWOOD, D. A.: The isolation of mutants. In: Methods in Microbiology. Vol. 3A. Norris, J. R. & D. W. Ribbons (eds.) 363-430. Academic Press. New York-London (1970)

HUANG, L.; ALBERS-SCHONBERG, G.; MONAGHAN, R. L.; JAKUBAS, K.; PONG, S. S.; HENSENS, O. D.; BURG, R. W.; OSTLIND, D. A.; CONROY, J. & E. O. STAPLEY: Discovery, production and purification of the Na^+,K^+ activated ATPase inhibitor L-681,110 from the fermentation broth of Streptomyces sp. MA-5038. J. Antibiot. **37**, 970-975 (1984)

IKEDA, H.; INOUE, M. & S. OMURA: Improvement of macrolide antibiotic-producing streptomyces strains by the regeneration of protoplasts. J. Antibiot. **36**, 283-288 (1983)

JANGLOVA, Z.; SUCHY, J. & Z. VANEK: Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. VII. Intracellular ATP concentration in Streptomyces aureofaciens. Folia Microbiol. **14**, 208-210 (1969)

KASS, I. S.; WANG, C. C.; WALROND, J. P. & O. W. STRETTON: Avermectin B_{1a}, a paralyzing antihelmintic that affects interneurons and inhibitory motoneurons in Ascaris. Proc. N.A.S. USA **77**, 6211-6215 (1980)

KINSKY, S. C.: Alterations in the permeability of Neurospora crassa due to polyen antibiotics. J. Bacteriol. **82**, 889-897 (1961)

KURTH, R.: Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycinbildung und Optimierung einer pO_2-Feeding-Fermentation. Dissertation Universität Tübingen (1981)

LIU, C.; McDANIEL, L. E. & C. P. SCHAFFNER: Factors affecting the production of candicidin. Antimicrob. Agents Chemother. **7**, 196-202 (1975)

LONGLEY, R. P.; ROSE, A. H. & B. A. KNIGHTS: Composition of the protoplast membrane from Saccharomyces cerevisiae. Biochem. J. **108**, 401-412 (1968)

LUNDIN, A.; RICKARDSSON, A. & A. THORE: Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. Anal. Biochem. **75**, 611-620 (1976)

MARTIN, J. F.: Control of antibiotic synthesis by phosphate. Adv. Biochem. Eng. **6**, 105-127 (1977)

MARTIN, J. F.: Manipulation of gene expression in the development of antibiotic production. In: Antibiotics and other secondary metabolites. 19-37. Hütter, R.; Leisinger, T.; Nüesch, J. & W. Wehrli (eds.). Academic Press. London-New York-San Francisco (1978)

MARTIN, J. F. & A. L. DEMAIN: Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev. **44**, 230-251 (1980)

MARTIN, J. F.; LIRAS, P. & A. L. DEMAIN: ATP and adenylate energy charge during phosphate-mediated control of antibiotic synthesis. Biochem. Biophys. Res. Com. **83**, 822-828 (1978)

MARTIN, J. F. & L. E. McDANIEL: The submerged culture production of the polyen antifungal antibiotics candidin and candihexin. Dev. Ind. Microbiol. **15**, 324-337 (1974)

MARTIN, J. F. & L. E. McDANIEL: Biosynthesis of candicidin by phosphate-limited resting cells of Streptomyces griseus. Eur. J. Appl. Microbiol. **3**, 135-144 (1976)

MASUMA, R.; TANAKA, Y. & S. OMURA: Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by the use of natural zeolite and its significance in the study of biosynthetic regulation of the antibiotic. J. Ferment. Technol. **61**, 607-614 (1983)

MASUMA, R.; TANAKA, Y.; TANAKAKA, H. & S. OMURA: Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate depressed fermentation using phosphate-trapping agents. J. Antibiot. **39**, 1557-1564 (1986)

NAGAHAMA, N.; SUZUKI, M.; AWATAGUCHI, S. & T. OKUDA: Studies on a new antibiotic, albocycline. Isolation, purification and properties. J. Antibiot. Ser. A **20**, 261-266 (1967)

NORMAN, A. W.; SPIELVOGEL, A. M. & R. G. WONG: Polyen antibiotic - sterol interaction. Adv. Lipid Res. **14**, 127-170 (1976)

ODDS, F. C.; CHEESMAN, S. L. & A. B. ABBOTT: Suppression of ATP in Candida albicans by imidazole and derivative antifungal agents. Sabouraudia **23**, 415- 424 (1985)

OMURA, S.: The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis. Bacteriol. Rev. **40**, 681-697 (1976)

OMURA, S.: Macrolide antibiotics. Chemistry, biology and practice. Academic Press. Orlando-San Diego-New York-London-Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo (1984)

OMURA, S.: Philosophy of new drug discovery. Microbiol. Rev. **50**, 259-279 (1986)

OMURA, S.; TANAKA, Y.; KITAO, C. & Y. IWAI: Stimulation of leucomycin production by magnesium phosphate and its relevance to nitrogen catabolite regulation. Antimicrob. Agents Chemother. **18**, 691-695 (1980)

OMURA, S.; OTOGURO, K. & H. TANAKA: The structure of virustomycin A. J. Antibiot. **36**, 1783-1786 (1983)

PAGET, G. E. & A. L. WALPOLE: Some cytological effects of griseofulvin. Nature **182**, 1320-1321 (1958)

PONG, S.S.; WANG, C. C. & L. C. FRITZ: Studies on the mechanism of action of avermectin B_{1a}: Stimulation of release of γ-aminobutyric acid from brain synaptosomes. J. Neurochem. **34**, 351-358 (1980)

POTTER, V. R. & A. E. REIF: Inhibition of an electron transport component by antimycin A. J. Biol. Chem. **194**, 287-297 (1954)

RABENHORST, J.: Valclavam - Ein antifungisches β-Lactam. Fermentation, Isolierung, Biogenese und biologische Wirkung. Dissertation Universität Tübingen (1986)

RACZYNSKA-BOJANOWSKA, K.; RUCZAJ, Z.; SAWNOR-KORSZYNSKA, P. & A. RAFALSKI: Limiting reactions in activation of acyl-units in biosynthesis of macrolide antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. **3**, 162-167 (1973)

REUSCHENBACH, P.: Pigmente aus dem Streptomyceten Streptomyces aburaviensis var. tuftformis TÜ 1250/8. Dissertation Universität Tübingen (1986)

ROBBERS, J. E. & H. G. FLOSS: Physiological studies on ergot: Influence of 5-methyltryptophan on alkaloid biosynthesis and incorporation of tryptophan analogs into protein. J. Pharm. Sci. **59**, 702-703 (1970)

ROBBERS, J. E.; ROBERTSON, L. W.; HORNEMANN, K. M.; JINDRA, A. & H. G. FLOSS: Physiological studies on ergot: Further studies on the induction of alkaloid biosynthesis by tryptophan and its inhibition by phosphate. J. Bacteriol. **112**, 791-796 (1972)

RODPHAYA, D.; SEKIGUCHI, J. & Y. YAMADA: New macrolides from Penicillium urticae mutant S11R59. J. Antibiot. 39, 629-635 (1986)

RUTTLOFF, H.; HUBER, J.; ZICKLER, F. & K. H. MANGOLD: Biometrische Versuchsplanung. In: Industrielle Enzyme. VEB Fachbuchhandel. Leipzig (1978)

SCHANZ, D.: Antibiotika aus Aspergillus fumiculosus. Untersuchungen zur Isolierung, Charakterisierung und Wirkungsweise. Dissertation Universität Tübingen (1978)

SINGER, J. S. & G. L. NICOLSON: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science **175**, 720-731 (1972)

SKORUPINSKY, B.: Albocyclin, ein Antibiotikum mit spezifischer Wirkung gegen Archaebakterien. Diplomarbeit Universität Tübingen (1985)

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York (1967)

TAKAHASHI, M.; IWASAKI, S.; KOBAYASHI, H. & S. OKUDA: Studies on macrocyclic lactone antibiotics. XI. Anti-mitotic and anti-tubulin activity of new antitumor antibiotics rhizoxin and its homologues. J. Antibiot. **40**, 66-72 (1987)

TAKATSU, T.; NAKAYAMA, H.; SHIMAZU, A.; FURIHATA, K.; IKEDA, K.; FURIHATA, K.; SETO, H. & N. OTAKE: Rustmicin, a new macrolide antibiotic, active against wheat stem rust fungus. J. Antibiot. **38**, 1806-1809 (1985)

TAKIGUCHI, Y.; MISHIMA, H.; OKUDA, M. & M. FERAO: Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: Fermentation, Isolation and physico-chemical properties. J. Antibiot. **33**, 1120-1127 (1980)

TOWNSEND, M. E.; WRIGHT, H. M. & D. A. HOPWOOD: Efficient mutagenesis by near ultraviolet light in the presence of 8-methoxypsoralen in streptomyces. J. Appl. Bacteriol. **34**, 799-801 (1971)

WHILEY, P. F.; GERZON, K.; FLYNN, E. H.; SIGAL, M. V.; WEAVER, O.; QUARCK, U. C.; CHAUVETTE, R. R. & R. MONAGHAN: Erythromycin. X. Structure of erythromycins. J. Am. Chem. Soc. **79**, 6062-6070 (1957)

WOODWARD, R. B.: Struktur und Biogenese der Makrolide. Eine neue Klasse von Naturstoffen. Angew. Chemie **69**, 50-58 (1957)

YAMAGUCHI, H.: Antagonistic action of lipid components of membranes from Candida albicans and various other lipids on two imidazole antimycotics, clotrimazole and miconazole. Antimicrob. Agents Chemother. **12**, 16-25 (1977)

ZÄHNER, H.: Einige Aspekte der Antibiotika-Forschung. Angew. Chemie **89**, 696-703 (1977)

ZÄHNER, H.: The search for new secondary metabolites. In: Antibiotics and other secondary metabolites. Hütter, R.; Leisinger, T.; Nüesch, J. & W. Wehrli (eds.). 1-17. Academic Press. New York-London (1978)

ZÄHNER, H.; HÜTTER, R. & E. BACHMANN: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 23. Mitteilung. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Microbiol. **36**, 325-349 (1960)

ZÄHNER, H. & W. K. MAAS: Biology of antibiotics. Springer Verlag. Berlin (1972)

Lebenslauf

25. 4. 1958	geboren in Stuttgart
3/1965–3/1968	Grundschule Ruit/Filder
4/1968–7/1968	Eduard-Mörike-Grundschule Böblingen
8/1968–7/1970	Albert-Einstein-Gymnasium Böblingen
8/1970–5/1977	Otto-Hahn-Gymnasium Böblingen
5. 5. 1977	Reifeprüfung
ab WS 1978	Biologie-Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
18. 7. 1980	Diplom-Vorprüfung in Biologie
4/1983–3/1984	Diplomarbeit am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Prof. Dr. H. Zähner, mit dem Thema: Isolierung eines antifungischen Antibiotikums aus Streptomyces galbus
30. 3. 1984	Diplom-Hauptprüfung in Biologie
seit 4/1984	Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner

Meine akademischen Lehrer waren:

C. F. Bardele, F. W. Bentrup, V. Braun, D. Bunke, K. Grell, D. Mecke, V. Hemleben, C. Jönsson, G. Jung, O. Klee, W. Loeffler, F. Oberwinkler, K. Poralla, A. Rieker, E.-M. Sander, W. Sauer, B. Schwemmle, H. U. Seitz, W. Seyffert, J. Strähle, R. G. Werner, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Wolf, H. Zähner.